

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND. PHARM.

Petter Moi

---

**Nytt diagnostisk verktøy for  
kvantifisering av tumormarkøren  
ProGRP i plasma med LC-MS**

---



**AVDELING FOR FARMASØYTISK KJEMI,**

**FARMASØYTISK INSTITUTT,**

**DET MATEMATISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET**

**UNIVERSITETET I OSLO**

**HØSTEN 2006**

Petter Moi

---

**Nytt diagnostisk verktøy for  
kvantifisering av tumormarkøren  
ProGRP i plasma med LC-MS**

---

Hovedfagsoppgaven ble utført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitetet i Oslo i perioden november 2005 til november 2006.

Veiledere:

Professor Léon Reubsaet, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Cand. Pharm. Bjørn Winther, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Professor Elsa Lundanes, Kjemisk Institutt, Universitetet i Oslo

## FORORD

Jeg vil først rette en stor takk til professor Léon Reubsæet og stipendiat Bjørn Winther som har vært til uvurderlig hjelp med viktig og meget god veiledning under hele hovedfagsarbeidet. En spesiell takk til Bjørn for alltid å være behjelpelig med små og store problemer på labben og under skrivingen. En takk rettes også til professor Elsa Lundanes for veiledning underveis og til professor Elisabeth Paus ved Det Norske Radiumhospitalet for donasjon av His-ProGRP (31-98)-prøver.

Videre vil jeg takke resten av de ansatte ved Faggruppen for Legemiddelanalyse for godt miljø.

En stor takk til Hanne, Kari, Torill og Marte for godt kontormiljø i året som har gått. En spesiell takk til Hanne som jeg har vært så heldig å dele mine frustrasjoner og gleder med under hele hovedfaget. Året hadde ikke vært det samme uten deg.

Takk til alle kaffepause-kompanjonger i året som har gått.

Til slutt, takk Siri, for at du har støttet meg gjennom tykt og tynt i fem år. Takk for et fantastisk samarbeid. Dine evner som motivator, korrekturleser og ikke minst kjæreste har vært gull verdt for meg.

Oslo, 1.november 2006

Petter Moi

# INNHALDSFORTEGNELSE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>FORORD .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>1. SAMMENDRAG.....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>2. FORKORTELSER .....</b>  | <b>7</b>  |
| <b>3. INNLEDNING OG HENSIKT .....</b>                                 | <b>10</b> |
| 3.1. INNLEDNING .....   | 10        |
| 3.2. HENSIKT .....  | 11        |
| <b>4. TEORI.....</b>  | <b>13</b> |
| 4.1. KROMATOGRAFI .....   | 13        |
| 4.2. RAM-KOLONNER .....   | 14        |
| 4.3. MOBILFASE .....  | 15        |
| 4.4. GRADIENTELUERING .....   | 16        |
| 4.5. LC-SYSTEMET .....  | 16        |
| 4.6. MS.....  | 16        |
| 4.7. PROTEINER OG PEPTIDER .....                                      | 19        |
| 4.8. PROTEOMIKK .....   | 21        |
| 4.9. TRYPTISK KLIPP AV PROTEINER .....                                | 24        |
| 4.10. PROGRP .....  | 25        |
| 4.11. NHS-ESTERE .....  | 27        |
| 4.12. INTERN STANDARD .....   | 29        |
| 4.13. LC-MS/MS I PEPTIDIDENTIFIKASJON .....                           | 30        |
| <b>5. MATERIALER OG METODER .....</b>                                 | <b>33</b> |
| 5.1. KJEMIKALIER, ANALYTTER OG UTSTYR .....                           | 33        |
| 5.2. TILLAGING AV LØSNINGER .....                                     | 35        |
| 5.2.1. Tillaging av peptidløsninger.....                              | 35        |
| 5.2.2. Tillaging av NHS-reagens .....                                 | 36        |
| 5.2.3. Tillaging av trypsinløsninger.....                             | 36        |
| 5.2.4. Tillaging av Lys-C løsninger .....                             | 36        |
| 5.2.5. Valg og tillaging av buffer.....                               | 36        |
| 5.2.6. Tillaging av mobilfaser .....                                  | 36        |
| 5.2.7. Tillaging av 8 M urea.....                                     | 37        |
| 5.2.8. ABC.....   | 37        |
| 5.3. PRØVEOPPARBEIDELSE AV PLASMAPRØVER .....                         | 37        |
| 5.4. DIGEST MED TRYPSIN .....   | 37        |
| 5.5. PREDIGEST MED LYS-C .....  | 37        |
| 5.6. ACETYLERING AV PEPTIDER MED AC-NHS .....                         | 38        |
| 5.6.1. Innledende forsøk med acetylering av peptider med ac-NHS.....  | 38        |
| 5.6.2. NT 1-8 som modells substans.....                               | 38        |
| 5.6.3. Inaktivering av ac-NHS med NH <sub>3</sub> .....               | 38        |
| 5.7. TILLAGING AV INTERN STANDARD (BATCH).....                        | 39        |
| 5.8. VERIFISERING AV KLIPPPRODUKTET NLLGLIEAKACENR MED LC-MS/MS ..... | 40        |
| 5.9. KALIBRERINGSKURVER I VANDIG MILJØ .....                          | 41        |
| 5.10. KALIBRERINGSKURVER I PLASMA .....                               | 41        |
| 5.11. PASIENTPRØVER.....  | 42        |
| 5.12. EVALUERING AV METODEN .....                                     | 42        |
| 5.12.1. Linearitet .....  | 42        |
| 5.12.2. Ukjente prøver.....   | 42        |
| 5.12.3. Repeterbarhet .....   | 42        |
| 5.12.4. Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) .....   | 43        |
| 5.13. OPPSETT AV APPARATUR .....                                      | 43        |
| 5.13.1. Oppsett av LC-MS for vandige prøver .....                     | 43        |
| 5.13.2. Oppsett av LC-MS for plasmaprøver .....                       | 43        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.14. MOBILFASEHASTIGHET.....   | 45        |
| 5.15. GRADIENTPROGRAMMER.....   | 45        |
| 5.16. DETEKSJON.....  | 46        |
| <b>6. RESULTATER OG DISKUSJON.....</b>  | <b>47</b> |
| 6.1 INNLEDENDE FORSØK.....  | 47        |
| 6.1.1. Analyse av ProGRP (31-98).....   | 47        |
| 6.2. ACETYLERING MED AC-NHS.....  | 48        |
| 6.2.1. Innledende forsøk med ac-NHS estere.....   | 48        |
| 6.2.2. Verifisering av acetyleringsprodukt med LC- MS/MS.....                           | 52        |
| 6.2.3. Tids- og mengdeaspekt ved acetyleringsreaksjoner.....                            | 54        |
| 6.2.4. Inaktivering av ac-NHS.....  | 57        |
| 6.2.5. Optimalisering av innaktiveringsmetode av ac-NHS med NH <sub>3</sub> .....       | 59        |
| 6.2.6. Kontrollanalyse av intern standard (batch).....                                  | 60        |
| 6.3. KALIBRERINGSKURVER I VANDIG MILJØ.....   | 61        |
| 6.3.1. Kalibreringskurver med- og uten NH <sub>3</sub> tilsetning.....                  | 61        |
| 6.3.2. Kalibreringskurve for ProGRP (31-98) og intern standard som klippes separat..... | 63        |
| 6.3.3. Kalibreringskurve med flere punkter og lavere ProGRP (31-98)-konsentrasjon.....  | 64        |
| 6.4. PLASMAPRØVER.....  | 65        |
| 6.4.1. Innledende forsøk med plasmaprøver.....  | 65        |
| 6.4.2. Plasmaprøver med Lys-C.....  | 67        |
| 6.4.3. Kalibreringskurve i plasma.....  | 68        |
| 6.4.5. Kalibreringskurver med og uten tilsetning av intern standard.....                | 70        |
| 6.5. EVALUERING AV METODEN.....   | 72        |
| 6.5.1. Ukjent prøve.....  | 72        |
| 6.5.2. Linearitet.....  | 73        |
| 6.5.3. Repeterbarhet.....   | 73        |
| 6.5.4. LOD og LOQ.....  | 74        |
| 6.6. PASIENTPRØVER.....   | 75        |
| <b>7. KONKLUSJON.....</b>   | <b>77</b> |
| <b>8. REFERANSELISTE.....</b>   | <b>79</b> |
| <b>9. APPENDIKS.....</b>  | <b>82</b> |

## 1. SAMMENDRAG

Småcellet lungekreft har høy metastaseinsidens ved primær diagnose, rask cellvekst og høy dødelighet. ProGRP er en nylig oppdaget spesifikk biomarkør for denne sykdommen. De nåværende kvantifiseringsmetodene baserer seg på immunologiske metoder som RIA og ELISA. Målet med oppgaven var å utvikle en LC-MS metode for kvantifisering av ProGRP ved bruk av spesifikke tryptiske klippprodukter fra det rekombinante peptidet ProGRP (31-98), som er en fellessekvens for tre isoformer. Tidligere arbeid har vist at tryptisk klipp av ProGRP (31-98) ga flere peptidprodukter, og NLLGLIEAK viste seg å være det mest fordelaktige produktet til å monitorere ProGRP. En intern standard ble laget ved hjelp av derivatiseringsreagenset ac-NHS, som under optimale betingelser spesifikt acetylerer lysin (K). Acetylert ProGRP (31-98) ble deretter tilsatt til både vandige- og plasmaprøver som intern standard. Trypsin utfører digest etter lysin og arginin, men enzymet vil ikke klare å digestere lysin når aminosyren er acetylert. Dette medfører at trypsin kun klipper etter arginin. Produktet var følgende etter acetylering og tryptisk digest; NLLGLIEAKacENR. Denne aminosyresekvensen ble verifisert med LC-MS/MS. Intern standarden ble tilsatt før prøveopparbeidelsen, og korrigerte på denne måten for variasjoner som følge av proteinfelling, inndamping, reløsing, tryptisk digest og tilfeldige feil i analysen på LC-MS.

Flere ledd i acetyleringsprosessen ble optimalisert. Det ble etablert kalibreringskurver, med og uten intern standard tilsetning, i vandig miljø så vel som i plasmaprøver. Kalibreringskurvene, tilsatt intern standard, ga en  $R^2$ -verdi på 0,999 både i vandige- og plasmaprøver. Kalibreringskurven som ikke var tilsatt intern standard ga en  $R^2$ -verdi på 0,843. LOD for ProGRP (31-98) ble kalkulert til 660 pg O.C. Pasientprøver fra lungekreftpasienter ble forsøkt kvantifisert. Det kan tenkes at en slik derivatisering av spesifikke peptidprodukter kan benyttes for kvantitativ bestemmelse av andre biomarkører. Ved å kvantifisere et spekter av biomarkører kan det oppnås en bredere og mer fullstendig diagnose. Dette viser at LC-MS kan bli et verdifullt verktøy for biomarkørmediert diagnose i fremtiden.

## 2. FORKORTELSER

|                      |  |
|----------------------|--|
| ABC                  | Ammonium bikarbonat  |
| Ac-NHS               | Acetyl N-Hydroxy Succinimide ester   |
| ACN                  | Acetonitril  |
| ADS                  | Akyl-Diol-Silica   |
| APCI                 | Atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon<br>(Atomic Pressure Chemical Ionization)       |
| CH <sub>3</sub> COOH | Eddiksyre  |
| CEA                  | Carcinoembryonic Antigen   |
| Da                   | Dalton   |
| ED                   | Utbredt sykdom (Extensive Disease)   |
| ESI                  | Elektrospray ionisering (Electrospray ionization)                                |
| GRP                  | Gastrin Releasing Peptide  |
| HCOOH                | Maursyre   |
| HPLC                 | Væskeskromatografi (High-Performance Liquid-Chromatography)                      |
| HSA                  | Humant Serum Albumin   |
| H <sub>2</sub> O     | Vann   |
| LC-MS                | Væskeskromatografi-Massepektrometri<br>(Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) |
| LD                   | Begrenset fremskreden sykdom (Limited Disease)                                   |
| Lys-C                | Lysobacter enzymogenes C   |
| M                    | Molar  |
| mL                   | Milliliter   |
| mM                   | Millimolar   |
| mRNA                 | Messenger RNA (ribonucleic acid)   |

|                 |   |
|-----------------|---|
| m/z             | Forholdet masse/ladning                                   |
| N <sub>2</sub>  | Nitrogengass  |
| NH <sub>3</sub> | Ammoniakk   |
| NT 1-8          | Neruotensin 1-8   |
| NSE             | Neuron Spesifikk Enolase                                  |
| NSCLC           | Ikke-småcellet lungekreft (Non Small Cell Lung Cancer)    |
| O.C             | On Column   |
| ProGRP          | Pro Gastrin Releasing Peptide                             |
| RAM             | Restricted Access Materials                               |
| RPC             | Omvendt fase kromatografi (Reversed Phase Chromatography) |
| RSD             | Relativt standardavvik (Relative Standard Deviation)      |
| SCLC            | Småcellet lungekreft (Small Cell Lung Cancer)             |
| SEC             | Eksklusjonskromatografi (Size Exclusion Chromatography)   |
| SIM             | Selektiv ionemonitorering (Selektive Ion Monitoring)      |
| tr              | Retensjonstid   |
| TEA             | Trietanolamin   |
| TIC             | Total ionestrøm (Total Ion Current)                       |
| µL              | Mikroliter  |
| Å               | Ångstrøm  |
| A               | Alanin  |
| C               | Cystein   |
| D               | Aspartat  |
| E               | Glutamat  |
| F               | Fenylalanin   |
| G               | Glysin  |
| H               | Histidin  |



|     |              |
|-----|--------------|
| I   | Isoleucin    |
| K   | Lysin        |
| L   | Leucin       |
| M   | Metionin     |
| N   | Asparagin    |
| P   | Prolin       |
| Pyr | Pyroglutamyl |
| Q   | Glutamin     |
| R   | Arginin      |
| S   | Serin        |
| T   | Treonin      |
| V   | Valin        |
| W   | Tryptofan    |
| Y   | Tyrosin      |

### 3. INNLEDNING OG HENSIKT

#### 3.1. Innledning

Lungekreft er den krefttypen det er høyest forekomst av i verden i dag. I industrialiserte land er lungekreft den hyppigste årsaken til kreftdødsfall. I europeiske samfunn utgjør lungekreft 29% av alle kreftdødsfall, og 21% av alle typer kreft hos menn (1). Prognosen og behandlingsregime avhenger av utstrekningen av tumoren, og dens histologiske celledsubtype. Lungekreft kan deles inn i småcellet lungekreft (small cell lung cancer - SCLC), plateepitelcarcinom, primært adenocarcinom og storcellet lungecarcinom. Småcellet lungekreft skiller seg klinisk og biologisk fra de andre lungekrefttypene grunnet sine nevroendokrine differensieringsegenskaper. Krefttyper som ikke er SCLC opptrer likt med tanke på prognose og terapi, noe som har ført til at samlebetegnelsen ikke-småcellet lungekreft (non-small cell lung cancer-NSCLC) har blitt brukt for disse. Småcellet lungekreft har høy metastaseinsidens ved primær diagnose. Kreftformens sensitivitet for kjemoterapeutisk behandling og radioterapi er god, forutsatt tidlig diagnose (2). Småcellet lungekreft deles vanligvis inn i limited disease (LD) og extensive disease (ED). Median overlevelse etter diagnose varierer fra 14-20 og 7-10 måneder for henholdsvis LD og ED (3). Selv om denne kreftformen er sensitiv for kjemoterapeutisk behandling, er den totale overlevelseshraten mindre enn 5 % fem år etter diagnose. Det er sjelden pasienter med extensive disease overlever i et langtidsperspektiv, og mer enn 80 % av pasienter med limited disease dør innen 3 år (4). Dette understreker at tidlig oppdagelse av patologisk tilstand er viktig.

Plasma og serum er nyttige matrikser for å kunne detektere og kvantifisere proteiner og peptider assosiert med sykdom. Slike proteiner og peptider antydes med biomarkører og har diagnostisk verdi. Den diagnostiske verdien kan ha stor betydning for om patologiske tilstander oppdages tidlig. Progastrin-releasing peptide (ProGRP) er nylig identifisert som en biomarkør for småcellet lungekreft (1). En biomarkør responderer på en biologisk prosess assosiert med cellevekst. Markøren kan hjelpe til å få stilt tidlig diagnose, antyde prognose og tumorbeliggenhet, monitorering av terapi, oppdagelse av tumorrelaps og eventuelle metastaser (5). GRP er en potent mitogen faktor for tumortyper som pankreas-, prostata-, renal-, bryst-, colon- og småcellet lunge-tumor (6). I tillegg er GRP blitt definert som en potent inducer av

angiogenese (7). Det er derfor mulig at biomarkører som GRP i fremtiden kan være mål for medisinerings (drugtarget). Tilstedeværelse av spesifikke biomarkører i forhøyet konsentrasjon kan indikere sykdom, prognose eller hvordan responsen er på terapien pasienten mottar. ProGRP er forløperen til gastrin-releasing peptide (GRP), og produseres i store mengder av SCLC-celler. ProGRP er bygd opp av 125 aminosyrer, mens GRP har en peptidkjede på 27 aminosyrer (6; 8). GRP er det mammalske motstykket til bombesin, og har en utstrakt distribusjon i hele kroppen. Konsentrasjonen av begge disse peptidene er forhøyet i sirkulasjonssystemet ved malignitet. Bruken av GRP som en diagnostisk biomarkør lar seg ikke gjøre på grunn av dårlig stabilitet i blod (9). Som en følge av dette benyttes i stedet ProGRP som en spesifikk biomarkør. I friske personer er gjennomsnittskonsentrasjonen av ProGRP målt til å være  $12,6 \pm 6,9$  pg/mL. For henholdsvis LD og ED er verdiene  $862 \pm 1204$  pg/mL og  $1645 \pm 1491$  pg/mL (10). Cut-off verdien settes vanligvis til 50 pg/mL (1).

En måte å oppnå en differensiert kreftdiagnose kan være å bruke et spekter av biomarkører. De nåværende metodene baserer seg på radioimmunoassay (RIA) og Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (5; 6; 11-13). Biomarkører som har blitt brukt til dette formålet er neuron-spesifikk enolase (NSE), carcinoembryonic antigen (CEA) og pro-gastrin-releasing-peptide (ProGRP) (4).

Utviklingen av væskechromatografi koblet til massespektrometri (LC-MS) for å bestemme diagnostiske proteiner/peptider er på nåværende tidspunkt i startfasen. Flere rapporter har vist at biomarkører kan identifiseres med LC-MS (11), men det er få rapporter som beskriver absolutt biomarkørkvantifisering ved hjelp av LC-MS (14).

### **3.2. Hensikt**

Målet med denne oppgaven er å utvikle en kvantitativ analyse for biomarkøren ProGRP (31-98) i plasma ved hjelp av en intern standard som skal muliggjøre kvantifisering og monitorering av biomarkøren. Det er tatt utgangspunkt i tidligere arbeid (11), hvor det ble utført seleksjon av det mest fordelaktige peptidproduktet for deteksjon av ProGRP (31-98). Derivatiseringsreagenset, ac-NHS, skal brukes til å acetylere ProGRP (31-98). Det tryptiske klippproduktet av acetylt ProGRP (31-98) skal brukes som intern standard. Denne intern standarden har tilnærmet like fysikalsk/kjemiske-egenskaper som det spesifikke peptidproduktet som skal monitoreres. Acetyleringsreaksjonen skal optimaliseres og

kalibreringskurver etableres i vandige- så vel som i plasmaprøver. Deretter skal metoden utprøves på pasientprøver. Metoden skal evalueres med hensyn på parametre som repeterbarhet og linearitet, i tillegg til at LOD og LOQ skal bestemmes.

## 4. TEORI

### 4.1. Kromatografi

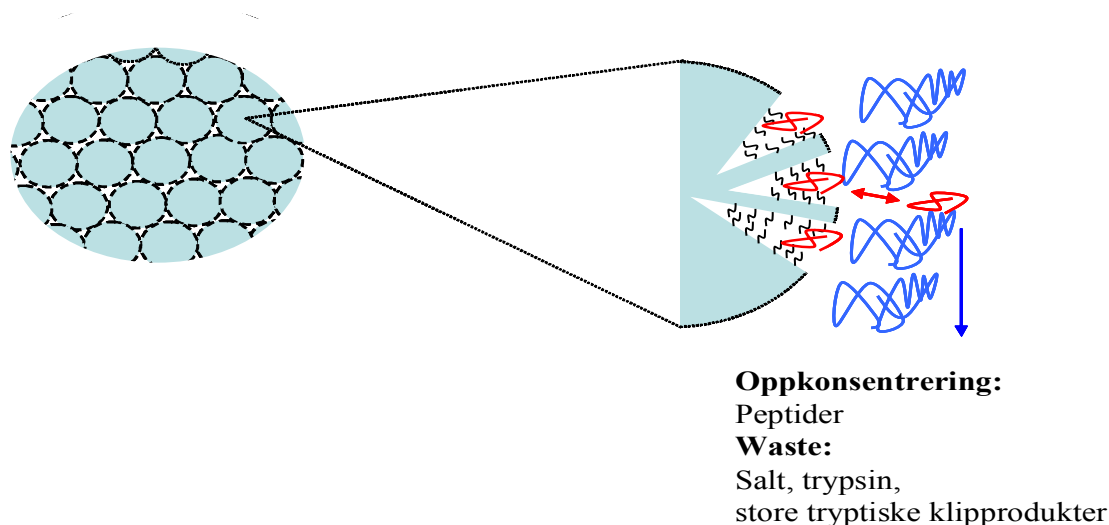
Kromatografi er en samlebetegnelse for separasjonsprinsipper av stoffer. Stoffene fordeler seg mellom en stasjonær fase og en mobilfase. Ved væskerkromatografi sitter stasjonærfasen på innsiden av en kolonne og mobilfasen pumpes igjennom. Stasjonærfase består ofte av porøse partikler med aktive grupper på overflaten. Disse gruppene danner interaksjoner med stoffene og gjør at stoffene retarderes på kolonnen. Mobilfasen har en sammensetning som gjør at disse interaksjonene brytes, og stoffene elueres ut av kolonnen. Stoffene fordeler seg ulikt mellom disse fasene og vil elueres ut ved forskjellige tidspunkter. En optimal mobilfase har en sammensetning som eluerer ut alle stoffene i en prøve og separerer de fullstendig. Stoffene detekteres av en detektor, og de kan ses i et kromatogram.

Retensjonen i et kromatografisk system kan styres ved å forandre egenskaper til stasjonærfase og mobilfase, endre mobilfasens hastighet, lengde på kolonnen, temperatur og analyttenes egenskaper i prøven.

I RPC er stasjonærfasen hydrofob og mobilfasen en vandig løsning. Stoffer retarderes på omvendt-fase-materialer ved hydrofob interaksjon. Det finnes silikabaserte kolonnematerialer med ulik lengde på alkylkjedene. Lengdene varierer i de fleste tilfeller fra C2-C18, hvor C står for karbon og tallet står for kjedens lengde. For eksempel har C8-kolonner oktylkjeder bundet til silikaoverflaten. Jo lengre alkylkjeden er, jo mer retensjon. Grunnlaget for retensjon er van der Waalske krefter som virker mellom stasjonærfase og analytt. Peptider har hydrofobe områder i strukturene og RPC vil dermed føre til retensjon og separasjon på kolonnen. I denne oppgaven ble det brukt en BioBasic-C8 omvendt fase kolonne. En ulempe med silikabaserte RPC-kolonner er muligheten for restsilanogrupeer som kan gi interaksjoner med protonerte stoffer og gi haledannelse på toppen. For å bli kvitt dette problemet blir silikamaterialet såkalt endcapped, og de vil ikke kunne interagere med protonerte stoffer.

## 4.2. RAM-kolonner

LiChrospher<sup>®</sup>ADS RAM-kolonner er en type omvendt fase sorbenter, som muliggjør LC-integrert prøveopparbeidelse av biologiske væsker (15; 16). RAM-kolonner tillater direkte prøvopåsetting og oppkonsentrering av hydrofobe lavmolekylære analytter fra ubehandlede komplekse prøver. Slike prøvematrikser kan være plasma, serum, melk, spytt, supernatanter fra cellekulturer og vev og homogenisert mat. Ekstraksjon og fraksjonering med RAM-kolonner er basert på to kromatografiske prinsipper som skjer samtidig, omvendt fase kromatografi og SEC. LiChrospher<sup>®</sup>ADS har en porestørrelse på rundt 60 Å, som er en fysisk diffusjonsbarriere. Hydrofile, elektronøytrale dioler er bundet til den utvendige overflaten til de sfæriske partiklene som kolonnen er pakket med. Dette inerte laget forhindrer kontaminasjon av sorbenten og tillater multiinjeksjoner av biologiske væsker. Bare den innvendige overflaten av de porøse partiklene er hydrofob stasjonærfase (C-4, C-8, C-18 alkyl kjeder). Disse kjedene er absorpsjonssentre som er tilgjengelige for lavmolekylære prøvemateriale. Makromolekyler som proteiner og store peptider som veier over 15000 Da, klarer ikke å penetrere porene og vil elueres ut i dødvolumet til kolonnen. Figur 4.1 viser prinsippet til en RAM-kolonne. Lavmolekylære analytter penetrerer porene og interagerer med alkylkjedene. Store peptider og proteiner blir, grunnet sin størrelse, skylt ut i waste.



Figur 4.1: Prinsippet til en RAM-kolonne, hvor analytten (merket rødt) trenger inn i porene, mens store peptider/proteiner (merket blått) skylles ut i waste.

### 4.3. Mobilfase

Mobilfase for RPC består av blandinger av vandige løsninger og organiske løsningsmidler som er blandbare med vann. Økes andel av organisk løsningsmiddel, øker styrken på mobilfase og retensjonen av analyttene avtar. De fleste silikabaserte kolonnematerialer krever pH mellom 2 og 8 i mobilfase. Blir pH lavere enn 2 kan de funksjonelle gruppene spaltes av, mens en pH over 8 vil kunne medføre at silikamaterialet løses opp (17). Ved separasjon av peptider på RPC-kolonner benyttes lav pH i mobilfase. MS-deteksjon krever flyktig mobilfase, og det ble derfor brukt maursyre og acetonitril som mobilfasekomponenter i denne oppgaven. Ved å bruke lav pH, vil syre- og basegruppene i peptidene hovedsakelig foreligge på protonert form. Dette medfører at peptidene hovedsakelig vil bære positiv ladning, siden de basiske gruppene i terminalene og i sidekjedene vil være fullstendig ionisert. Syregrupper i sidekjedene vil stort sett være uionisert, mens de terminale karboksylsyregruppene vil være delvis ionisert. For å få robuste analysemetoder, er det viktig å velge en pH hvor retensjonen varierer lite med små endringer i mobilfasens sammensetning. Det er uheldig å velge pH nær  $pK_a$ -verdien fordi små endringer i pH medfører store endringer i retensjon. pH bør også være slik at stoffene enten er fullstendig

ionisert eller ioniseringen er undertrykket. Som nevnt må pH i tillegg være i området 2-8 siden det ble brukt en silikabasert stasjonærfase.

#### **4.4. Gradienteluering**

Omvendt fase kromatografi kan utføres på tre måter; isokratisk, som gradient, eller som en kombinasjon av disse. Isokratisk analyse medfører at retensjonstiden kan bli svært lang i en blanding av mange stoffer. Dette kan løses ved å bruke gradienteluering, der polariteten på mobilfasen minsker ved å øke andel av organisk løsningsmiddel. Gradienteluering gir generelt sett dårligere separasjon av analyttene. Alternativet er å variere mellom gradientkjøring og isokratisk eluering. På denne måten bedres separasjonen av og elueringstidene for analyttene, samtidig som analysen kan gjennomføres raskere enn ved ren isokratisk kjøring.

#### **4.5. LC-systemet**

HPLC-systemet består av to mobilfasereservoar, to pumper, en autoinjektor, en degasser og en kolonne. Gjennom pumpene blir de to mobilfasene blandet i ulike forhold i et blandekammer, slik at det dannes en gradient over kolonnen. Etter hvert som konsentrasjonen av organisk modifikator øker, vil de ulike analyttene elueres ut av kolonnen. Degasseren brukes for å hindre at det kommer luft i systemet som kan forårsake ujevn væskehastighet. Når massespektrometer brukes som detektor er det viktig at alle komponentene i mobilfasen er flyktige, ellers kan det dannes salter i ionekilden som tetter igjen kapillæret i massespektrometeret.

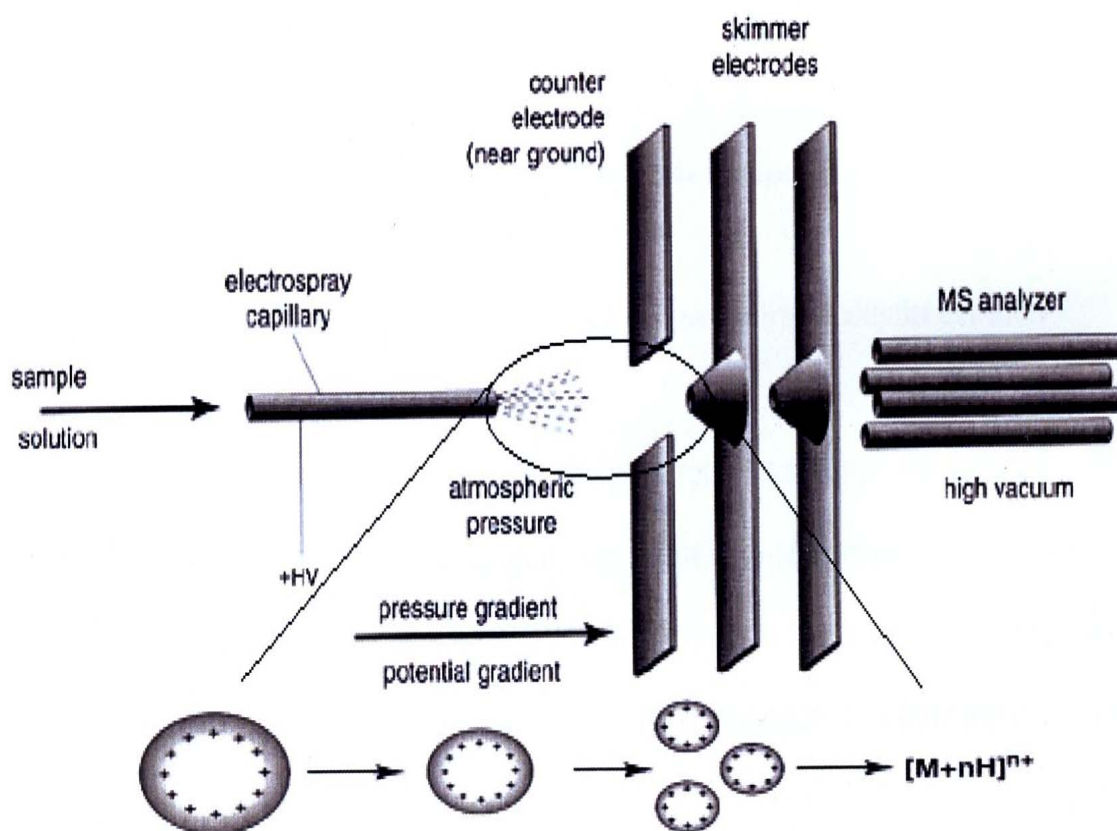
#### **4.6. MS**

Massespektrometri har blitt førstevalget ved protein- og peptidanalyser. Grunnlaget for dette ligger i massespektrometerets sensitivitet, oppløsning, massenøyaktighet og evne til å danne informasjonsrike ionespektra. Et massespektrometer (MS) omdanner komponenter i en blanding til ioner og analyserer dem etter masse over ladning ( $m/z$ ). MS-systemet består av tre essensielle deler; en ionekilde som produserer ioner av prøven, en masseanalysator som analyserer ioner etter massetall, i tillegg til en detektor som detekterer ionene som kommer fra analysatoren (18).



### *Ionisering*

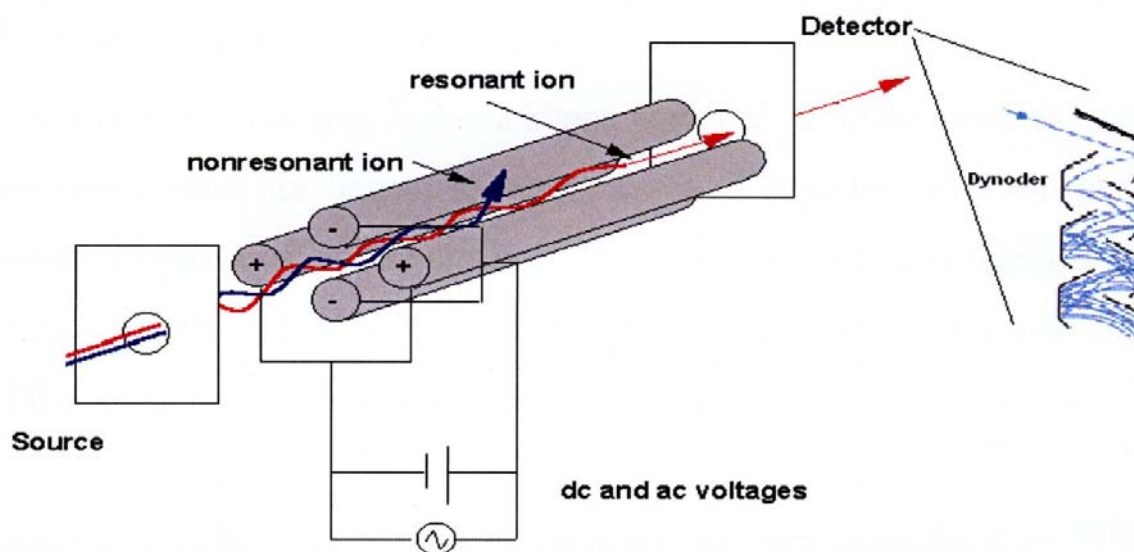
Det finnes flere ioniseringsteknikker innen massespektrometri. De vanligste er APCI, som er mest brukt for upolare molekyler, og ESI, som er mest brukt for polare molekyler. Siden ESI var ioniseringen (figur 4.2. (19)) som ble brukt i denne oppgaven, er metoden nærmere beskrevet under.



*Figur 4.2: Massespektrometer med ESI. Nederst i figuren er ionefordampningen illustrert.*

Når mobilfasen kommer inn i innførings- og ioniseringsenheten i ESI, dannes små dråper ved hjelp av et elektrostatisk felt og forstøvergass,  $N_2$ . Avhengig av spenningen i ESI-kapillæret (se

electrospray capillary i figur 4.2), blir dråpene enten positivt eller negativt ladet. Dråpene blir deretter mindre når de treffer en strøm av tørkegass,  $N_2$ . Etter hvert øker frastøtningen mellom ionene inne i dråpen. Når frastøtingen blir større enn overflatespenningen, vil dråpene bli mindre dråper gjennom Coulombeksplosjon. Denne prosessen fortsetter helt til ionefordampning oppnås. Videre innover i massespektrometeret passerer ionene gjennom et kapillær og forbi et sett av samlere og linser som fokuserer ionestrømmen. Inngangen av kapillæret har alltid motsatt ladning i forhold til ionene som skal analyseres, slik at ionene akselereres. Trykket reduseres fra atmosfærisk trykk til  $10^{-6}$ - $10^{-8}$  Torr mellom inngangen av kapillæret og samlerne. ESI danner flere ganger ladede ioner når molekylionene blir store og har flere ioniserbare grupper. Ved analyse av proteasebehandlede prøver, vil det kunne dannes svært mange peptider med like  $m/z$ -verdier. Det er derfor en stor fordel å kunne detektere et peptid ved flere  $m/z$ -verdier.



Figur 4.3: Illustrasjon av en kvadrupol med en electron multiplier detektor.

### *Masseanalysator*

Ved LC-MS er de mest brukte masseanalytorene kvadrupol og ionefelle. I denne oppgaven ble det brukt kvadrupol (figur 4.3.(20).) Den består av fire parallelle sylindere som pålegges vekselspanning. Alle ionene som passerer inn, vil bli påvirket av denne spenningen. Ustabile ioner vil kollidere med staven, mens ionene som oppnår stabile svingninger i kvadrupolfeltet vil bevege seg mot detektoren avhengig av ionets  $m/z$ -forhold. I detektoren emitteres elektroner når ioner som kommer fra kvadrupolen treffer den første dynoden. Antall elektroner er direkte proporsjonal med mengden ioner som entrer detektoren. Signalet blir amplifisert gjennom en kaskadereaksjon av sekundære elektroner som dannes fra dynode til dynode. Ved hjelp av dette signalet blir antallet ioner bestemt for hver  $m/z$  verdi etter hvert som de passerer kvadrupolen. Ved hjelp av en datamaskin presenteres signalene som spektra og/eller kromatogrammer. Som nevnt er LC-MS et viktig verktøy i bioanalyse som følge av lave deteksjonsgrensener og høy spesifisitet. LC-MS viser dessuten god presisjon og nøyaktighet. Det er likevel viktig med god prøveopparbeidelse på grunn av forurensinger som selv i lave konsentrasjoner kan påvirke kvantifiseringen som følge av detektorens høye følsomhet.

### *Deteksjonsmuligheter*

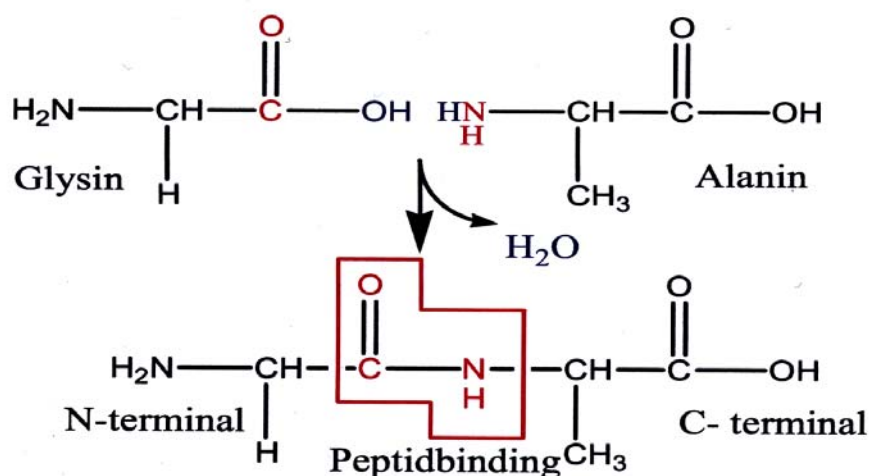
Massespektrometeret kan ta opp informasjon etter ulike prinsipper. I single MS er det to muligheter; fullt sveip og selektiv ionemonitorering. Ved fullt sveip (SCAN) tas massespektret opp for et ønsket  $m/z$ -verdi område. Man vil da få et totalt ionestrømskromatogram (TIC-kromatogram) som viser ionenes totale intensitet som funksjon av retensjonstid. Ved selektiv ionemonitorering (SIM) måles det kun på en eller flere bestemte  $m/z$ -verdier. Massekromatogrammet viser intensiteten av den eller de bestemte  $m/z$ -verdiene som funksjon av retensjonstiden.

## **4.7. Proteiner og peptider**

I kroppen blir 20 ulike aminosyrer brukt når peptider og proteiner syntetiseres. Alle utenom prolin, er  $\alpha$ -aminosyrer. De har en karboksylsyregruppe og aminogruppe bundet til samme

karbonatom. Dette kalles  $\alpha$ -karbonatomet. Ulikheten mellom aminosyrene ligger i sidekjedene som varierer i struktur, polaritet og elektrisk ladning. De kan deles opp i fem ulike grupper og eksempler på aminosyrer for hver gruppe er nevnt i parentes; de basiske (arginin og lysin), de basiske (arginin og lysin), de nonpolare alifatiske (glysin og alanin), de uladede polare (serin og cystein), de sure (aspartat og glutamat) og de aromatiske (tyrosin og fenylalanin). Sidekjedene fører til at alle aminosyrene har ulik hydrofobisitet og syre/base egenskaper. De har hver sine  $pK_a$ -verdier for sidekjeden samt for  $\alpha$ -karboksylgruppen og  $\alpha$ -aminogruppen.  $pK_a$ -verdiene for  $\alpha$ -karboksylgruppen ligger for de ulike aminosyrene mellom 1,82 og 2,36, mens verdiene for  $\alpha$ -aminogruppen ligger mellom 9,04 og 10,96. Sidekjedene er unike for hver enkelt aminosyre og  $pK_a$ -verdien varierer fra 3,65 til 12,48. Et mangfold av ulike peptider og proteiner kan dannes fordi aminosyrene kan settes sammen i alle mulige rekkefølger.

I proteiner og peptider blir aminosyrene kovalent bundet sammen med peptidbindinger. Kjeden kan variere i lengde fra to til flere tusen aminosyrer. Dannelsen av peptidbindinger skjer ved en kondensasjonsreaksjon, der det blir avspaltet vann (se figur 4.4). Den enden av aminosyrekjeden med en fri  $\alpha$ -aminogruppe kalles N-terminalen, mens enden med fra karboksylsyregruppe kalles C-terminalen.



Figur 4.4: Dannelse av et dipeptid: To aminosyrer bundet sammen med peptidbinding som vist i *rød ramme*, avspalting av vann er vist med *blått*.

Peptider og proteiner har ulik hydrofobisitet grunnet forskjellene i aminosyrenes sidekjerder. Selv forskjeller på én aminosyre kan ha betydning for polariteten. Dette kan utnyttes i analytisk separasjon, slik at to peptider kan skilles fra hverandre i et kromatografisk system.

#### 4.8. Proteomikk

Proteomikk er læren om hvordan proteiner dannes fra gener til funksjonelle proteiner. Beskrivelse av sykdomsspesifikke kvantitative og kvalitative forandringer i et bestemt proteom kalles ”diagnostisk proteomikk”. Når det gjelder proteinene, som er det funksjonelle uttrykket for informasjonen som ligger i genene, brukes gjerne uttrykket proteomics som tilsvarende genomics, handler om studiene av funksjonene til alle de proteinene som er resultatet av den genetiske informasjonen i en celle. Proteomet består av alle proteiner uttrykt fra genomet. Proteomikk er studiet av proteomet. Dette kan sees på som øyeblikksbilder fordi mengdene er dynamiske og endres over tid (21) (se figur 4.5.).

**DNA → Genom (”genomikk”)**

↓

**mRNA**

↓

**Proteiner → Proteom (”proteomikk”)**

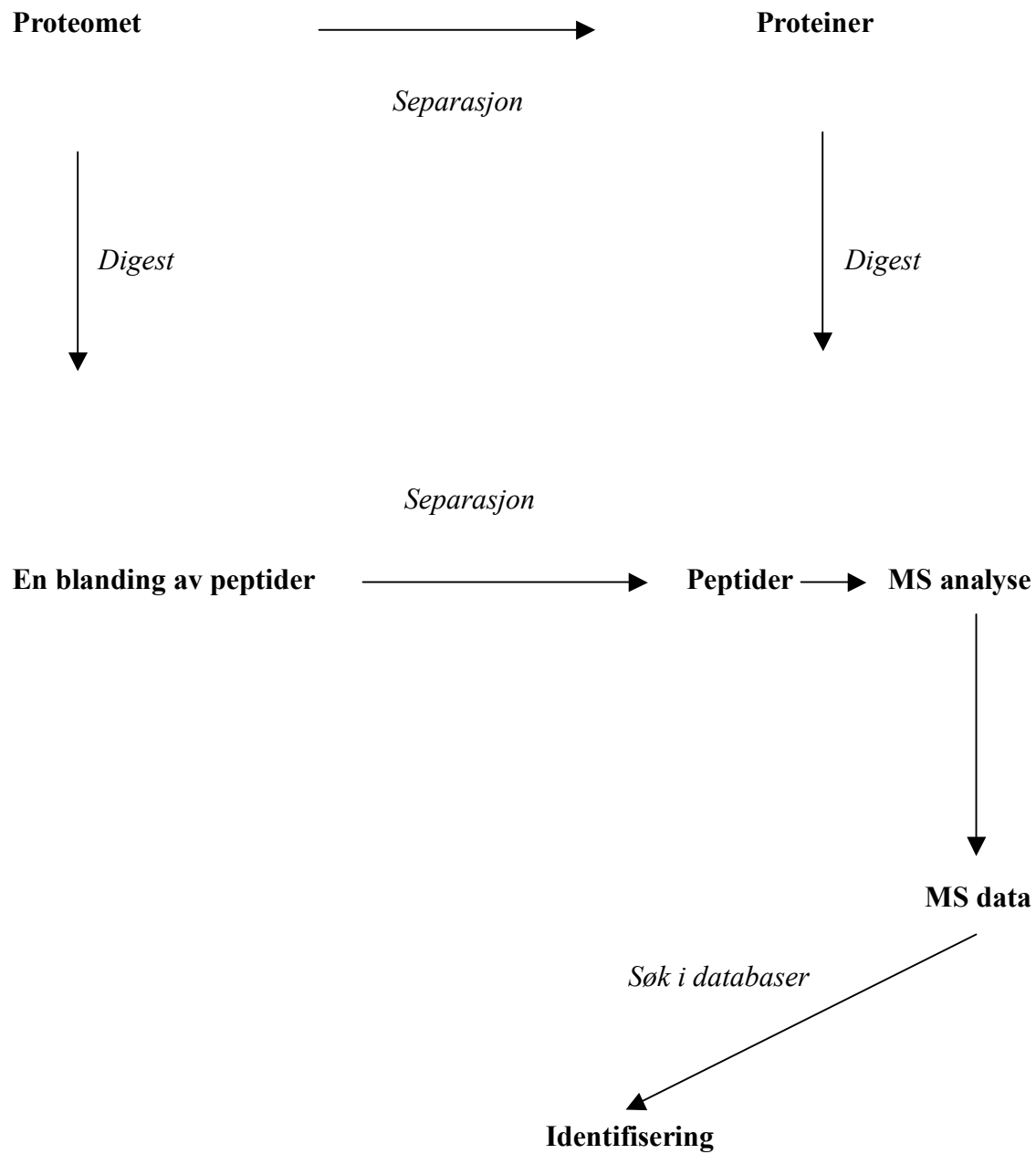
↓

**Cellefunksjoner**

*Figur 4.5: Biokjemisk kontekst av genomikk og proteomikk*

Selv om hele det humane genomet i dag er kjent, er det likevel viktig å studere uttrykket av proteinene. Konsentrasjonen av ulike proteiner sier mer om cellens funksjon enn genomet alene kan gjøre. Grunnen til dette er at mengden uttrykte proteiner ikke nødvendigvis har en direkte korrelasjon med nivået av mRNA i cellene.

Proteomikk har nå fire forskningsfelt. Det første består i å identifisere hele proteomet eller alle proteiner i en prøve. Det andre er å identifisere hvordan proteinene modifiseres, såkalt ”post translational modifications”. For det tredje området er formålet å se hvordan proteinene interagerer med hverandre og det siste området fokuserer på i hvor stor grad hvert protein blir uttrykt. Fordi cellene uttrykker ulike mengder i ulike tilstander er det i forbindelse med sistnevnte område at sykdomstilstander kan identifiseres eller behandlingseffekter måles (21). Proteinidentifisering er bygget på at de fleste peptidsekvensene på fem eller flere aminosyrer er unike i proteomet til en organisme. Bestemmelse av en peptidsekvens eller nøyaktig måling av dens masse, kan derfor identifisere hvilket protein peptidsekvensen kom fra. Dette gjøres ved å søke i databaser av proteinsekvenser. Figur 4.6 viser de essensielle elementene i tilnærmingen. De fleste proteomikkanalysene begynner med en blanding av proteiner. Denne blandingen inneholder intakte proteiner av ulik molekylvekt, modifiseringer og løselighet. Før peptidsekvenser oppnås, må proteinet bli klippet til peptider. Dette skyldes som nevnt at massespektrometeret vanligvis gir lave signaler når peptidmassen på intakte proteiner blir målt direkte. Selv om moderne MS instrumenter kan oppnå en mengde data selv fra komplekse peptidblandinger, vil det oppnås data på et større antall komponenter dersom det foretas en digest. Data fra MS blir eksportert inn i avanserte søkemotorer for identifisering av proteinet ut i fra peptidsekvensen (21). Det finnes flere søkemotorene, som for eksempel *ProteinProspector* (<http://prospector.ucsf.edu>) og *Mascot* (<http://www.matrixscience.com>).



Figur 4.6: Generelt flytskjema for proteomikkanalyser

#### 4.9. Tryptisk klipp av proteiner

I nesten alle storskalaprojekter innen massespektrometribasert proteomikk, brukes trypsin for å konvertere proteinmiksturer til mer analyserbare peptidblandinger (22). Trypsin innehar flere egenskaper som gjør den svært velegnet til digest, som for eksempel at enzymet er tilgjengelig som pulver med høy grad av renhet og i tillegg er robust nok til å kunne tåle flere ulike bruksområder (21). Det er flere grunner til at det er ønskelig å klippe proteiner før analyse med LC-MS. Sensitiviteten for bestemmelse av peptider er bedre enn ved direkte bestemmelse av intakte proteiner. Det er dessuten vanskelig å bestemme massen av store eller svært hydrofobe molekyler. I tillegg vil den absolutte feilkilden i masse bli større jo høyere proteinets masse er. For massebestemmelse av store proteiner vil det derfor være en fordel å få dannet mindre produkter før analyse på LC-MS. Dette kan gjøres ved hjelp av proteaser som trypsin. Enzymet klipper opp aminosyrekjeder på C-terminal side av arginin og lysin dersom prolin ikke er neste aminosyre. I de fleste proteiner er arginin og lysin fordelt slik at det dannes peptider med en godt egnet lengde for MS-deteksjon. Det er generert store databaser hvor massene til klippede produkter fra ulike proteiner er registrert. På bakgrunn av dette kan databasen identifisere hvilket protein de klippede produktene tilhører (21).

Klipping kan hovedsakelig gjennomføres på to måter; med eller uten denaturering (og påfølgende reduksjon og alkylering). Hvilken metode som velges avhenger av størrelse på proteinet/peptidet og tilstedeværelse av disulfidbindinger. For mindre proteiner som for eksempel ProGRP (31-98), kan trypsin alene (uten denaturering) være nok til å få dannet et tilstrekkelig antall produkter. For større proteiner som HSA, kan det med fordel utføres denaturering, redusering og alkylering. Enzymatisk digestering er krevende, grunnet proteinets/peptidets tettpakkede konfigurasjon som forhindrer tilgjengeligheten til proteasen. Ved bruk av trypsin alene kan det bli flere Lys-X eller Arg-X bindinger som ikke klippes, slik at produktene blir større og færre. Disse angis til vanlig med "miss cleavage". Dette medfører ufullstendig digest, og unøyaktigheter under en eventuell kvantifisering. For å oppnå en endepunktdigest, kan en predigest med Lys-C derfor være fordelaktig. Lys-C er et endoproteolytisk enzym som klipper spesifikt på C-terminalen til aminosyren lysin (23). Ved å benytte både Lys-C og trypsin vil det oppnås en mer fullstendig



digest av komplekse biologiske prøver som plasma. En slik dualdigest gjør prosessen mer komplisert og tidkrevende, men antall "missed cleavage" reduseres. Kvantifisering kan ved bruk av to endoproteaser derfor bli mer pålitelig.

#### 4.10. ProGRP

Den lungekreft-assosierte biomarkøren GRP blir i utgangspunktet syntetisert som et stort precursormolekyl, preProGRP (se figur 4.7). preProGRP konverteres til ProGRP(1-125) ved avklipping av signalsekvensen. ProGRP prosesseres videre til GRP, som består av 27 aminosyrer, ved endoproteolytiske kløyvinger av uidentifiserte endopeptidaser (6). ProGRP har til sammen 3 isoformer, det vil si at deler av aminosyresekvensen kan variere. En del av ProGRP er derimot felles for alle isoformene og denne delen kalles ProGRP (31-98) (6). Rekombinant peptid av denne sekvensen har derfor blitt brukt i utviklingen av nåværende ELISA- og RIA - metoder.

PreProGRP som er oppgitt i The National Service for Biotechnology Service sine nettsider: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

**MRGSELPLVLLALVLC LAPRGRA**

**1'VPLPAGGGTVLTKMYPRGNHWAVGHLMGKKSTGESSSVSERGSLKQQLREYIR  
WEEAARNLLGLIEAKENRNHQPPQPKALGNQQPSWDSSEDSSNFKDVGSKGKVGRLSAP  
GSQREGRNPQLNQQ -125'**

*Figur 4.7: Aminosyresekvensen til PreProGRP.*

*Merket **rødt**: Presekvens (signalsekvens). Merket **blått**: ProGRP (31-98)*

Siden ProGRP prosesseres med endoproteolytiske kløyvinger av endopeptidaser, ble det utført en tryptisk klipp av ProGRP (31-98) for å finne et spesifikt peptid som tillot monitorering av uforandret ProGRP så vel som dens produkter. Tabell 4.1. viser de mulige- og observerte tryptiske produktene målt med LC-MS (11), og massene som er oppgitt er monoisotopiske.

Tabell 4.1: Observerte og teoretiske (*in silico*) digest produkter fra ProGRP (31-98)(11).

| Observert | Aminosyresekvens  | Posisjon     | M <sub>r</sub> | [M+2H] <sup>2+</sup> |
|-----------|-------------------|--------------|----------------|----------------------|
| -         | STGESSSVSER       | 31-41        | 1123,484       | 563,242              |
| V         | GSLK              | 42-45        | 403,251        | 202,629              |
| V         | QQLR              | 46-49        | 543,321        | 272,664              |
| V         | EYIR              | 50-53        | 579,310        | 290,659              |
| V         | WEEAAR            | 54-59        | 760,358        | 381,183              |
| <b>V</b>  | <b>NLLGLIEAK</b>  | <b>60-68</b> | <b>969,594</b> | <b>485,801</b>       |
| -         | ENR               | 69-71        | 417,205        | 209,606              |
| -         | NHQPPQPK          | 72-79        | 944,490        | 473,245              |
| -         | ALGNQQPSWSEDSSNFK | 80-97        | 2008,884       | 1005,433             |
| -         | D                 | 98           | 133,027        | 67,513               |

Ioner med nettoladning 2+ er de mest forekommende i ESI-MS målinger. Komplet tryptisk klipp er observert i regionen som inneholder aminosyrer i posisjon 42-68 (11). Mangel på tilstedeværelse av de andre teoretiske klippproduktene kan forklares på flere måter. Blant disse er ufullstendig tryptisk klipp, ustabile produkter, for høy eller for lav kolonneretensjon, signalsuppresjon eller begrenset ionisering (11).

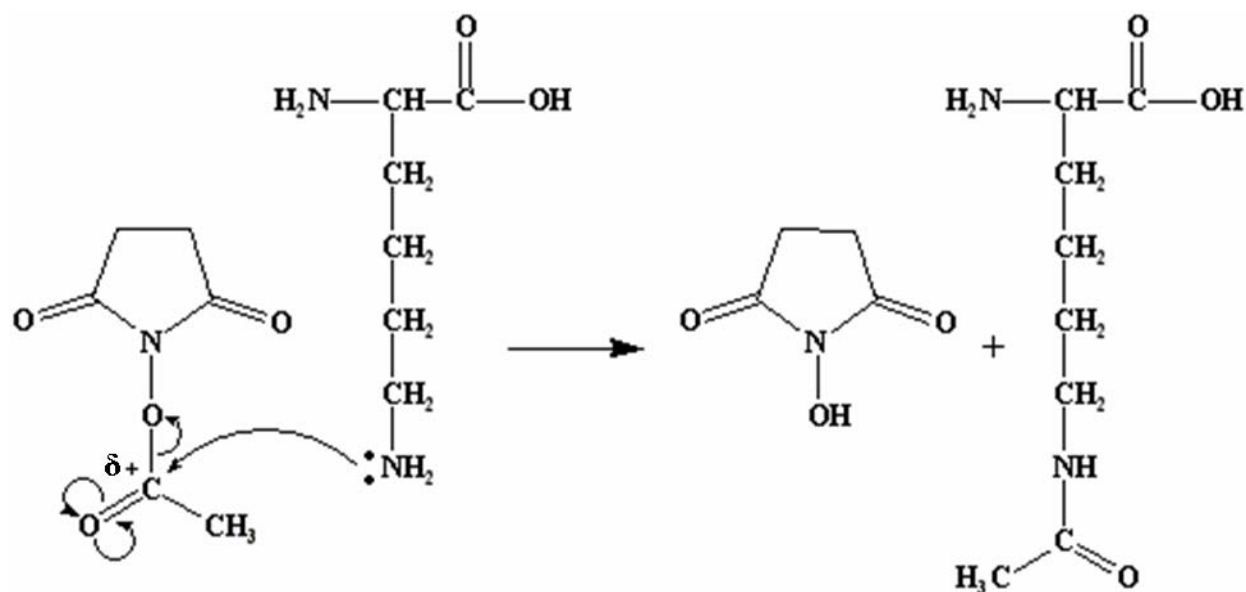
Ut av disse produktene velges det et peptid som ProGRP (31-98) kan monitoreres på. Utvelgelsen av produktet ble gjort etter vurderinger av faktorer som proteinspesifisitet, signalintensitet og kolonneretensjon. NLLGLIEAK (60-68) hadde det høyeste S/N-forholdet, samt at dette produktet er spesifikt for ProGRP. Produktet ga en kolonneretensjon som reduserte sannsynligheten for undertrykking og forstyrrende støy fra injeksjonsfronten (11) (se figur 6.1).

Ved å foreta et sekvenssøk i den nevnte søkemotoren The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) under kategorien Homo Sapiens,

fastslås det at produktet er spesifikt for ProGRP. En LC-MS/MS- analyse med fragmentering er utført for å verifisere aminosyresekvensen til produktet NLLGLIEAK (11) (figur 4.10).

#### **4.11. NHS-estere**

For å kunne kvantifisere ProGRP (31-98) ble det undersøkt hvordan en intern standard kunne produseres. Det ble valgt å se på acetylering med N-hydroksy succinimide estere. NHS-estere er labile forbindelser som er svært tilgjengelige for nukleofile angrep. Disse esterene har en god utgående gruppe, og angrepet vil skje på karbonet på estergruppen (se figur 4.8). I basisk, vandig miljø (pH >8), vil lysin og N-terminus være de mest reaktive nukleofile gruppene i peptidet. NHS-estere er mye brukte forbindelser for spesifikk acetylering av aminosyregrupper i peptider/proteiner/celler (24). NHS-estere finnes i flere varianter som har ulike funksjonelle grupper knyttet til seg som for eksempel acetyl-, butyl-, propyl- eller benzyl-gruppe. Acetyl-NHS ble, grunnet at acetylgruppen er den minste funksjonelle gruppen som peptidet kan bli derivatisert med, foretrukket som derivatiseringsreagens. Dette medfører at intern standarden får kjemiske/fysiske egenskaper som er mest mulig lik produktet som skal monitoreres. En selektiv acetylering av lysin er utgangspunktet for arbeidet med å fremskaffe en intern standard for ProGRP (31-98).



Figur 4.8: Reaksjonsmekanisme som viser hvordan ac-NHS acetylerer aminosyren lysin.

NHS-estere er relativt ustabile forbindelser som lett vil hydrolysere i vandig miljø. Hydrolysehastigheten er pH-avhengig og vil øke med økende pH. Når acetyleringsreaksjonen går ved høy pH, kan det medføre at andre aminosyrer blir mer reaktive (histidin og tyrosin), samt at basisk hydrolyse av NHS-estere kan forekomme i større grad. Det må derfor et pH-kompromiss til for å holde lysin-gruppene reaktive, samt for å hindre hydrolyse. Tilsetning av et organisk løsningsmiddel som ACN vil stabilisere NHS-esteren, og redusere hydrolysehastigheten (25). Hydrolysen av esteren vil foregå parallelt til og vil konkurrere med den ønskede acetyleringsreaksjonen. NHS-estere er svært reaktive og er derfor velegnet som derivatiseringsreagens, men det krever imidlertid at reaksjonsbetingelsene er under nøye kontroll.

#### 4.12. Intern standard

Å kunne kvantifisere ProGRP i plasma ved hjelp av en intern standard vil være et nyttig verktøy for å følge sykdommen fra diagnose, samt under og etter behandling. Den ideelle intern standarden er en isotop-analog til produktet (NLLGLIEAK) som skal kvantifiseres, noe som ikke finnes. Siden dette ikke er tilgjengelig ble intern standarden laget ved å la ProGRP (31-98) reagere med ac-NHS (se figur 4.8). Ac-NHS vil under optimale betingelser acetylere spesifikt på lysin (K) (25). Trypsin klipper etter aminosyrene lysin (K) og arginin (R). Når lysin er acetylt, vil det ikke forekomme tryptisk digest etter denne aminosyren. Dette skyldes trolig at bindingssetet til trypsin på lysin er okkupert av en acetylgruppe. Det medfører at digesten kun vil forekomme etter arginin. Tabell 4.2. viser teoretiske (in silico) klipprodukter etter reaksjon mellom ProGRP (31-98) og ac-NHS og tryptisk klipp. Massene i tabellen er monoisotopiske.

*Tabell 4.2: Teoretiske (in silico) klipprodukter fra ProGRP (31-98) etter acetylering med ac-NHS og tryptisk digest.*

| Aminosyresekvens                   | Posisjon     | M <sub>r</sub>  | [M+2H] <sup>2+</sup> | [M+3H] <sup>3+</sup> |
|------------------------------------|--------------|-----------------|----------------------|----------------------|
| STGESSVSR                          | 31-41        | 1123,484        | 563,242              |                      |
| GSLKacQQLR                         | 42-49        | 971,070         | 486,585              | 324,690              |
| EYIR                               | 50-53        | 579,310         | 290,659              |                      |
| WEEAAR                             | 54-59        | 760,358         | 381,183              |                      |
| <b>NLLGLIEAKacENR</b>              | <b>60-71</b> | <b>1412,570</b> | <b>706,785</b>       | <b>471,523</b>       |
| NHQPPQPKac<br>ALGNQQPSWSEDSSNFKacD | 72-98        | 2415,470        | 1208,735             | 806,157              |

Etter acetylering og tryptisk klipp av ProGRP (31-98), er intensjonen at NLLGLIEAKacENR (uthevet i tabell 4.2) skal fungere som en intern standard. Produktet har en acetylgruppe og tre aminosyrer (ENR) mer enn peptidproduktet som skal kvantifiseres (NLLGLIEAK). En LC-MS/MS analyse ble utført for å verifisere aminosyresekvensen til intern standarden.

### 4.13. LC-MS/MS i peptididentifikasjon

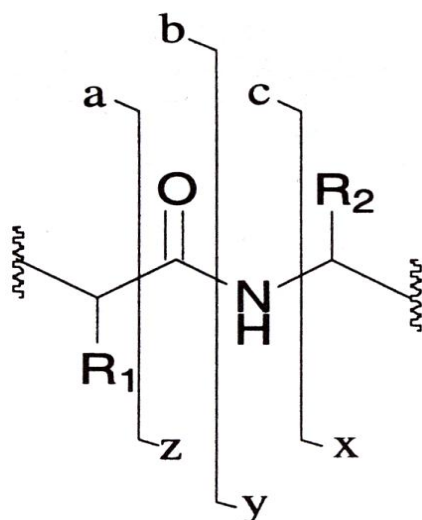
LC-MS og LC-MS/MS har mange fordeler i bioanalyse sammenlignet med konvensjonelle analysemetoder. Lave deteksjonsgrenser (pg-nivå), kort analysetid, høy spesifisitet, kompatibilitet for nesten alle analytter, god presisjon og nøyaktighet er eksempler på dette.

Det første trinnet i en MS/MS analyse er å velge ut  $m/z$ -verdien av interesse. Dette ionet fragmenteres ved hjelp av kollisjon med gassmolekyler. Massene til de resulterende fragmentene bestemmes i MS-trinn to. Som vist i figur 4.4. og tabell 4.3. har hver aminosyre ulik sidekjede som bestemmer sin unike struktur og residualmasse.

*Tabell 4.3: Monoisotopisk masse til aminosyreresidualer.*

| Aminosyre | Forkortelse | Monoisotopisk residualmasse |
|-----------|-------------|-----------------------------|
| Glysin    | G           | 57,05                       |
| Alanin    | A           | 71,08                       |
| Serin     | S           | 87,08                       |
| Prolin    | P           | 97,12                       |
| Valin     | V           | 99,13                       |
| Treonin   | T           | 101,11                      |
| Cystein   | C           | 103,14                      |
| Leucin    | L           | 113,16                      |
| Isoleucin | I           | 113,16                      |
| Asparagin | N           | 114,10                      |
| Aspartat  | D           | 115,09                      |
| Lysin     | K           | 128,17                      |
| Glutamin  | Q           | 128,13                      |

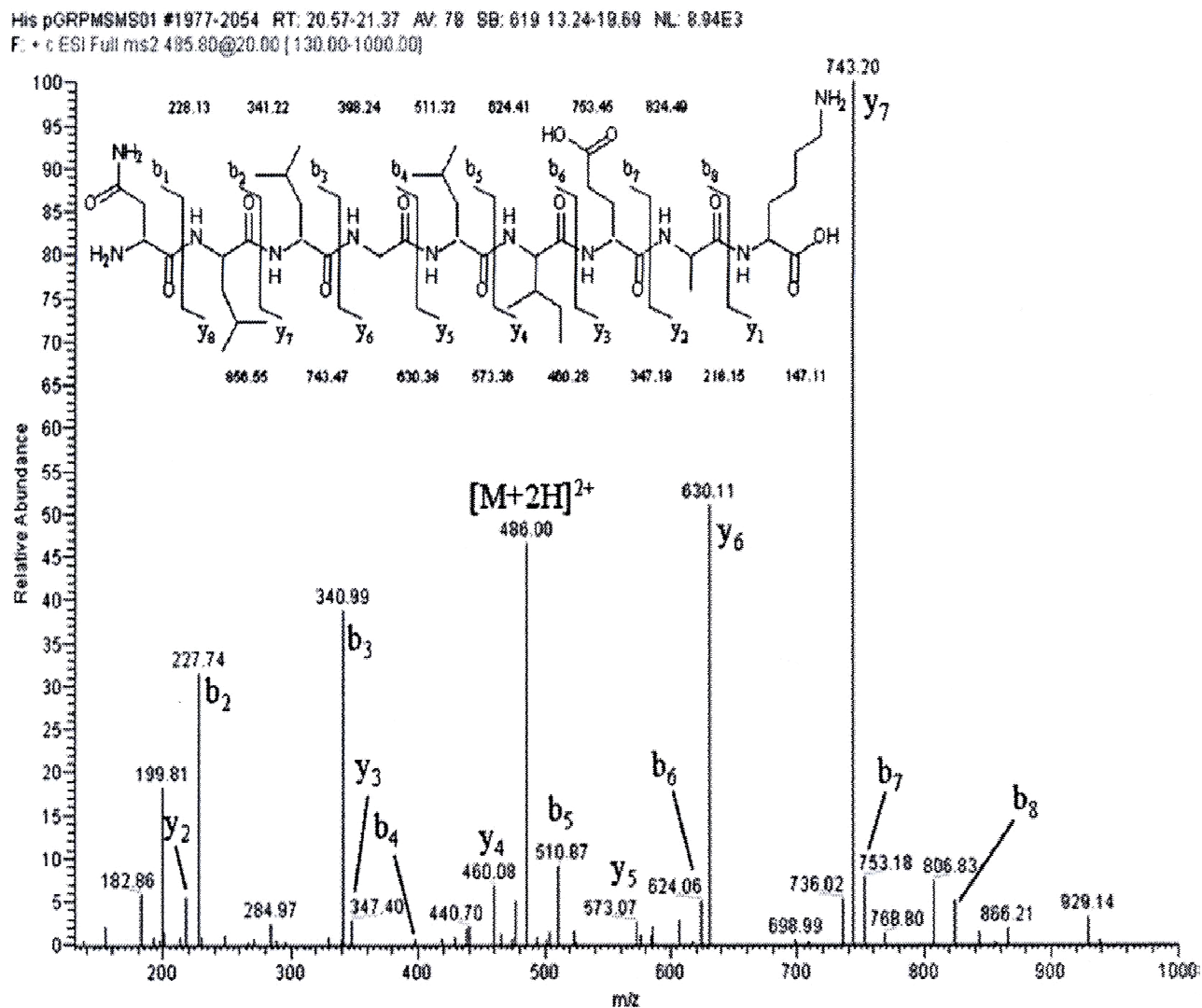
|             |   |        |
|-------------|---|--------|
| Metionin    | M | 131,19 |
| Histidin    | H | 137,14 |
| Fenylalanin | F | 147,18 |
| Arginin     | R | 156,19 |
| Tyrosin     | Y | 163,18 |
| Tryptofan   | W | 186,21 |



Figur 4.9: Skjematisk oversikt over nomenklatur for fragmentering av peptidioner.

Når peptidioner kolliderer med inert gass i trippel kvadrupol, Q-TOF eller en ionefelle, vil den kinetiske energien som absorberes indusere fragmentering. Den mest vanlige kløyvingen finner sted i bindingen mellom karbonyloksygenet og amidnitrogenet (se figur 4.9.), og det dannes y-ioner og b-ioner. Et y-ion er et positivt ladet fragment, hvor ladningen sitter på C-terminalen til det originale peptidionet, mens et b-ion har ladningen på N-terminalen til det originale peptidionet. Den andre halvdelens tapes som et nøytralt fragment. Andre kløyvinger er mer uvanlige, da de krever mer energi for å finne sted. b- og y-ionene i et MS/MS-spektra er

komplementære, og de indikerer sekvensen til peptidet. Det tryptiske klipproduktet, NLLGLIEAK ( $m/z = 485,8$ ), spesifikt for ProGRP, ble verifisert med en MS/MS analyse med fragmentering (11). Figur 4.10 viser MS/MS-spekteret av fragmenteringen av NLLGLIEAK. Fragmentationene  $b_2$ - $b_8$  og de komplementære  $y$ -ionene  $y_2$ - $y_7$  ble detektert, og identiteten til NLLGLIEAK ble verifisert. En lignende LC-MS/MS analyse ble utført for NLLGLIEAKacENR.



Figur 4.10: MS/MS-spektrum ved fragmentering av NLLGLIEAK (11).



## 5. MATERIALER OG METODER

### 5.1. Kjemikalier, analytter og utstyr

Tabell 5.1.-5.4. viser kjemikalier, analytter og utstyr brukt i laboratoriearbeidet til denne oppgaven.

Tabell 5.1: Liste over kjemikalier

| Kjemikalier          | Kvalitet                          | Leverandør                                |
|----------------------|-----------------------------------|---|
| ABC                  | Analytisk                         | Fluka, Buchs SG, Sveits                   |
| ACN                  | HPLC-kvalitet                     | Merck, Darmstadt, Tyskland                |
| CH <sub>3</sub> COOH | Analytisk                         | Prolabo, Manchester, England              |
| CH <sub>3</sub> OH   | HPLC-kvalitet                     | Merk, Darmstadt, Tyskland                 |
| HCOOH                | Analytisk                         | Riedel-de Haën, Seelze, Tyskland          |
| Humant plasma        |                                   | Ullevål Universitetssykehus, Oslo, Norge  |
| Lys-C                | Fra <i>Lysobacter enzymogenes</i> | Roche diagnostic GmbH, Mannheim, Tyskland |
| NH <sub>3</sub>      | Analytisk                         | Merk, Darmstadt, Tyskland                 |
| ac-NHS               | >98%                              | Research Organics, Cleveland, Ohio, USA   |
| Trietanolamin        | >99%                              | Fluka, Buchs SG, Sveits                   |
| Trypsin              | Fra bovin pankreas                | Sigma, St.Louis, MO, USA                  |
| Ureum                | 100 %                             | Norsk Medisinaldepot, Norge               |

Tabell 5.2: Liste over analytter

| <b>Analytter</b>   | <b>Leverandør</b>                |
|--------------------|----------------------------------|
| His-ProGRP (31-98) | Det Norske Radiumhospital, Norge |
| NT 1-8             | Bachem, Bubendorf, Sveits        |
| ProGRP (31-98)     | Det Norske Radiumhospital, Norge |

Tabell 5.3: Liste over utstyr i LC-MS oppsettet

| <b>Utstyr</b>     | <b>Modell</b>  | <b>Leverandør</b>                            |
|-------------------|--|--|
| System controller | SCL-10AVP  | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| Autoinjektor      | Sil-10AD VP  | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| Pumper            | LC-10AD VP   | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
|                   | LC7A   | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| Degasser          | DGU-14A  | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| Switch            | FVC-12AH   | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| MS-detektor       | LC-MS-2010 A   | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| Programvare       | Class VP Chromatography,<br>Datsystem Version 4.3    | Shimadzu, Kyoto, Japan                       |
| Analytisk kolonne | BioBasic-C8<br>Dim (mm) 50 x 1<br>Particle Sz (µm) 5 | Thermo Electron corporation,<br>Cheshire, UK |
| RAM-kolonne       | LiChrospher <sup>®</sup> ADS-C8                      | Merck, Darmstadt, Tyskland                   |

Tabell 5.4: Liste over øvrig utstyr

| Utstyr          | Modell                        | Produsent                                  |
|-----------------|-------------------------------|--|
| Automatpipetter | Finnpipette <sup>®</sup>      | Labsystems, Helsinki, Finland              |
| Inkubatorovn    | Termax                        | Termax, Bergen, Norge                      |
| pH-meter        | 632 pH-meter                  | Metrohm, Herisau, Sveits                   |
| Sentrifuge      | 1200/06                       | Hettich Universal, Tyskland                |
| Vannrenseanlegg | EASY Pure UV D7402            | Barnstead, Dubuque IA, USA                 |
| Varmeblokk      | Reacti.Therm III <sup>™</sup> | Pierce, Rockford, USA                      |
| Ristemaskin     | Vibramax 100                  | Heidolph, Tyskland                         |
| Vekt            | AE200S                        | Metler, Greifensee, Sveits                 |
| Vortex mikser   | Vibrofix VP1 electronic       | Janke & Kunkel IKA-WERK, Staufen, Tyskland |

## 5.2. Tillaging av løsninger

### 5.2.1. Tillaging av peptidløsninger

Peptidene som ble brukt var His-ProGRP (31-98) og ProGRP (31-98). Under utviklingen av metoden, ble det brukt rekombinant histidin-merket ProGRP (31-98) (His-ProGRP (31-98)) som en modellsubstans for ProGRP (31-98). Dette ble gjort av pris- og tilgjengelighetsmessige årsaker. Siden teknikken er basert på enzymatisk digest av biomarkøren, antas det at histidin-merkingen ikke påvirker på sluttresultatet. Dette er også verifisert ved å bruke ProGRP (31-98) som mangler denne histidinmerkingen, til spiking av plasmaprøver. Konsentrasjonen på løsningene var 1,2 mg/mL og 1,7 mg/mL. Det ble laget fortynningsrekker av peptidene på 100 µg/mL, 10 µg/mL og

1 µg/mL i 0,1 M TEA. Løsningene ble oppbevart i fryser ved -32 grader og ble kun tatt frem ved behov. Løsningene ble plassert i fryser straks de var ferdig benyttet.

#### **5.2.2. Tillaging av NHS-reagens**

Det ble laget en stamløsning på 100 mg/mL ved å veie inn 0,10 gram ac-NHS og løse det i 1 mL ACN i et glass med lokk. Deretter ble løsningen fortynnet til ønsket konsentrasjon og oppbevart i fryser ved -32 °C og kun tatt frem ved behov. Ac-NHS-løsninger ble benyttet kun et begrenset antall ganger grunnet dårlig stabilitet.

#### **5.2.3. Tillaging av trypsinløsninger**

Trypsin ble veid inn til vandige stamløsninger på 10 mg/mL og det ble laget en fortynningsrekke i vann på 1 mg/mL, 100 µg/mL og 10 µg/mL. Hvert rør inneholdt nok trypsin til kun 5-10 prøver, for å unngå at enzymet ikke mistet aktiviteten ved gjentatt opptining. Stamløsningene ble oppbevart i fryser ved -32 °C og kun tatt frem ved behov.

#### **5.2.4. Tillaging av Lys-C løsninger**

5 µg tørrstoff med Lys-C ble løst i 50 µL H<sub>2</sub>O ved hjelp av en sprøyte. Etter at alt var løst ble løsningen overført til 10 rør à 5 µL. Lys-C-løsningene ble oppbevart i fryser ved - 80 °C og kun tatt frem ved behov.

#### **5.2.5. Valg og tillaging av buffer**

Det har tidligere blitt vist at 0,1 M TEA som digest buffer er kompatibel med MS-deteksjon uten fortynning, samt at stabiliteten er god (11). Bufferen ble laget ved at 1,419 gram TEA ble veid inn og overført til en målekolbe og løst i ionebyttet vann til nesten fullt volum. pH ble justert til 7,5 med eddiksyre og deretter ble det fylt opp med vann til en liter. For 0,1 M TEA pH 8,5, nødvendig til acetyleringen, ble bufferen laget som beskrevet over, men justert til pH = 8,5.

#### **5.2.6. Tillaging av mobilfaser**

Mobilfase A bestod av 20 mM HCOOH, som ble laget ved å fortynne 755 µL maursyre til 1 liter ionebyttet vann i en målekolbe. Mobilfase B bestod av 95 % ACN og 5 % 20 mM HCOOH.

### 5.2.7. Tillaging av 8 M urea

Det ble satt an til 6 mL. Det ble veid inn og løst 2,95 gram urea i 3 mL ammonium bikarbonat (ABC). Etter at alt var løst ble det tilsatt ytterligere 1 mL ABC. Volumet ble da 6 mL.

### 5.2.8. ABC

Ny løsning med 100 mM ABC ble laget for hvert forsøk. De ble satt an til 10 mL. 0,079 gram ble veid inn og løst i 10 mL ionebyttet vann.

## 5.3. Prøveoppbehandling av plasmaprøver

Plasmaprøvene ble oppbevart i fryser ved -32 °C og ble tint opp ved å plassere beholderen under varmt vann. Ved en slik sjokktining vil trolig også copersipetanter felle ut. Plasmaprøven ble etter tining ristet på vortexrister i 10 sekunder. Det ble jobbet med både 200 µL og 1000 µL plasmaprøvevolum. Etter spiking og tilsetning av intern standard, ble prøvene satt på ristemaskin. Proteinfellingen ble utført ved å tilsette 50 %, dråpe for dråpe, kald (-32 °C) ACN mens glassene ble ristet lett på ristemaskin. Prøvene ble deretter ristet kraftig i 30 minutter til tydelig klar supernatant. Prøvene ble sentrifugert i 10 minutter før de ble dekantert over i nye rør. Glassene ble så plassert i en varmeblokk ved 60 °C og inndampet under påblåsning av N<sub>2</sub>. Prøvene ble reløst ved å tilsette 0,1 M TEA. Ved et plasmaprøvevolum på 200 µL, ble prøvene reløst i 200 µL TEA. Det viste seg å være vanskelig å få oppkonsentrering ved dette volumet fordi inndampet plasma og TEA ikke var lett å løse i mindre volum enn 200 µL. Når plasmavolumet var 1000 µL, ble prøvene reløst i 500 µL TEA, og prøvene ble dermed oppkonsentrert 2 ganger.

## 5.4. Digest med trypsin

Den enzymatiske klippeprosessen ble utført ved å bruke sekvensert klasse bovin trypsin i forhold enzym : protein 1:20. Den endelige konsentrasjonen på digest bufferen var 100 mM TEA med pH = 7,5. Digesten ble utført i varmeskap ved 37 °C i 24 timer.

## 5.5. Predigest med Lys-C

Det ble gjort noen forsøk med dualdigest, ved å benytte både trypsin og Lys-C. Peptidprøven ble etter inndamping (se avsnitt 5.3.) resuspendert i 200 µL 8 M urea. Det ble tilsatt Lys-C i forhold enzym : protein 1:100. Predigesten ble utført ved 37 °C i 4 timer. Trypsin mister aktivitet over

ureakonsentrasjon på 2 M. Prøven ble derfor fortynnet med 800  $\mu\text{L}$  TEA, for å være sikker på at konsentrasjonen av urea kom under 2 M. Deretter ble det utført trypsindigest som beskrevet over i avsnitt 5.4. Prøvene ble så dampet inn, resuspendert i 200  $\mu\text{L}$  TEA og analysert på LC-MS.

## **5.6. Acetylering av peptider med ac-NHS**

### **5.6.1. Innledende forsøk med acetylering av peptider med ac-NHS**

Acetyleringsreaksjoner ble utført ved at ProGRP (31-98) ble tilsatt kald ac-NHS i 200 x overskudd per lysin og N-terminal (se avsnitt 5.7). Reaksjonen foregikk i romtemperatur i 60 minutter, før det ble tilsatt 1:20 med trypsin og inkubert ved 37 °C i 24 timer.

### **5.6.2. NT 1-8 som modells substans**

Selv etter at ProGRP (31-98) var ferdig acetylet, ble det utført forsøk som skulle avdekke om ac-NHS fortsatt var reaktiv eller ikke. NT 1-8 ble først tilsatt ac-NHS og analysert, for å se om NT 1-8 lot seg acetylere. NT 1-8 inneholder lysin og vil dermed teoretisk kunne acetyleres av ac-NHS. Ved å tilsette acetylet ProGRP (31-98) til NT 1-8, ble det avdekket en eventuell acetylering av peptidet. Aminosyresekvensen til NT 1-8 er som følger:

Pyr- L- Y- G- N- K- P- R- OH

Acetyleringsreaksjonen av NT 1-8 ble monitorert via 2 ganger ladet acetylet molekyl ( $m/z = 537,1$ ). Fordelen ved bruk av et lite peptid som NT 1-8 som modells substans istedenfor ProGRP (31-98), er at den tidkrevende tryptiske klippen ikke er nødvendig.

### **5.6.3. Inaktivering av ac-NHS med $\text{NH}_3$**

$\text{NH}_3$  ble tilsatt for å oppnå en basisk hydrolyse av esteren. Etter 1 times reaksjon i basisk miljø, ble pH justert til 7,5 med  $\text{HCOOH}$ .  $\text{NH}_3$  og  $\text{HCOOH}$  ble fortynnet til henholdsvis 12,5 % og 50 % med vann før tilsetning. For å inaktivere ac-NHS ble det tilsatt 10  $\mu\text{L}$  12,5 %  $\text{NH}_3$  per 100  $\mu\text{L}$  ferdig acetylet ProGRP (31-98). Deretter ble pH justert til 7,5 ved tilsetning av 50 %  $\text{HCOOH}$ . Justeringen skjedde med kontinuerlig pH-måling og tilsetningen av syre ble stoppet ved ønsket pH-verdi.

### 5.7. Tillaging av intern standard (batch)

Etter å ha optimalisert acetyleringsreaksjonen, ble det etablert en standard metode for produksjon av intern standard. Det ble satt an til en batch på 5 mL med en konsentrasjon av ProGRP (31-98) på 20 µg/mL. Ved å tilsette 85 µL av 1,2 mg/mL ProGRP (31-98) til 5100 µL TEA (pH = 8,5), fikk produktene akseptable intensiteter i MS. Det molare overskuddet av ac-NHS ble kalkulert basert på det teoretiske antallet frie aminer som er tilstede i prøven (antall lysin + N-terminaler). Det ble tilsatt 200 x overskudd per antall lysin og N-terminaler. ProGRP (31-98) har følgende aminosyresekvens:

31-STGESSVSESGSLKQQLREYIRWEEAAR

NLLGLIEAKENRNHQPPQPKALGNQQPSWSEDSSNFKD-98

Denne sekvensen har 4 lysin (K) og 1 N-terminal og det molare overskuddet av ac-NHS blir da 200 x 5.

*Utgangspunkt:*

5100 µL av 20 µg/mL ProGRP (31-98) = 102 µg.

Antall mol ProGRP (31-98) = 0,102 g / 7600 g/mol =  $1,34 \times 10^{-5}$  mol.

200 x overskudd per lysin (4) og N-terminal (1)  $\rightarrow 1,34 \times 10^{-5}$  mol x 200 x 5 = 0,013 mol ac-NHS må tilsettes.

Molar masse på ac-NHS = 157,1 g/mol

Må tilsette: 157,1 g/mol x 0,013 mol = 2,11 g ac-NHS.

Bruker løsningen på 100 mg/mL og tilsetter:

100 mg/mL x X = 2,11 g

X = 21,1 mL ac-NHS.

Reaksjonen stod på benken i romtemperatur i 1 time.

Verifisering av fullstendig acetylering ble utført ved at 100 µL av batchen ble tatt ut og tilsatt 1:20 med trypsin og inkubert over natt. Denne prøven ble analysert i et program hvor det ble tatt opp et SIM-spekter for m/z-verdiene 485,8 (for ikke acetyliert ProGRP (31-98)) og 471,5 og 706,8 (for acetyliert ProGRP (31-98)). Dersom m/z = 485,8 ikke var tilstede ble det konkludert med at acetyleringen var fullstendig. Ac-NHS ble deretter inaktivert som beskrevet i avsnitt 5.6.3.

## 5.8. Verifisering av klipproduktet NLLGLIEAKacENR med LC-MS/MS

For å verifisere aminosyresekvensen til NLLGLIEAKacENR, ble produktet analysert på LC-MS/MS med fragmentering. Det ble benyttet en ionefelle MS/MS til dette formålet. Annet utstyr som pumper, degasser, system controller og kolonne var fra det samme oppsettet som tidligere beskrevet. Databasen proteinprospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) ble brukt for å generere in silico fragmenteringer. Deretter ble disse fragmenteringene sammenlignet med de faktiske fragmenteringene fra LC-MS/MS analysen. Det ble injisert 20 µL av en acetylt og digestert prøve. Parametrene var som følger:

**Sekvens:** NLLGLIEAKacENR

**Instrumenttype:** ESI-ionefelle

**Ioner som ble detektert:** a, b, x, y, I, h, n, B

**Peptidmasse  $MH^+$  (monoisotopisk) = 1411,7909**

**$MH^{2+}$  (monoisotopisk) = 706,82**

**$MH^{3+}$  (monoisotopisk) = 471,55**



### 5.9. Kalibreringskurver i vandig miljø

Det ble laget kalibreringskurver i vandig betingelser med 4 ulike konsentrasjoner av ProGRP(31-98); 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL og 20 µg/mL. 50 µL av hver prøve ble tilsatt 50 µL intern standard (batch). Trypsin ble tilsatt i forhold 1:20 og prøvene ble inkubert som tidligere beskrevet.

### 5.10. Kalibreringskurver i plasma

Det ble etablert kalibreringskurver med 7 ulike konsentrasjoner av ProGRP(31-98) og en blank prøve. Plasma ble sjokktinet under varmt vann og 200 µL ble fordelt på 8 rør. Deretter ble det rørene tilsatt konsentrasjoner av ProGRP (31-98) på 0,6 µg/mL, 1,2 µg/mL, 2,4 µg/mL, 3,6 µg/mL, 4,8 µg/mL, 6 µg/mL og 12 µg/mL. 100 µL intern standard ble tilsatt og alle prøvene ble ristet godt. Deretter ble det utført prøveopparbeidelse som beskrevet under avsnitt 5.3. Digesten ble utført ved at 2 µL 10 mg/mL trypsin ble tilsatt til alle prøvene som ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Injeksjonsvolumet var 20 µL. Topphøyden til ProGRP (31-98) ( $m/z = 485,8$ ) ble dividert på summen av topphøydene til intern standarden ( $m/z = 706,8$  og  $471,5$ ). Tabell 5.5. viser konsentrasjonene som ble brukt i plasmakalibreringskurvene, samt mengde- og antall mol O.C.

Tabell 5.5: Konsentrasjoner og mengder O.C kalibreringskurver i plasma.

| Rør       | Konsentrasjon (µg/mL) | O.C (ng) | Stoffmengde O.C (pmol) |
|-----------|-----------------------|----------|------------------------|
| 1         | 0,6                   | 12       | 1,6                    |
| 2         | 1,2                   | 24       | 3,1                    |
| 3         | 2,4                   | 48       | 6,2                    |
| 4         | 3,6                   | 72       | 9,3                    |
| 5         | 4,8                   | 96       | 12,4                   |
| 6         | 6                     | 120      | 15,5                   |
| 7         | 12                    | 240      | 31,1                   |
| 8 (blank) | 0                     | 0        | 0                      |

### 5.11. Pasientprøver

Plasmaprøver levert av Det Norske Radiumhospital på Montebello fra lungekreftpasienter ble analysert. Det var konstatert forhøyede innhold av NSE, og det ble derfor antatt at ProGRP-innholdet også var forhøyet. 200 µL plasma ble tilsatt 100 µL intern standard og opparbeidet som beskrevet i avsnitt 5.3. Deretter ble det spiket med ProGRP (31-98), for å tydeliggjøre og verifisere signalet til ProGRP. Intensitetene til signalene  $m/z = 485,8$  (NLLGLIEAK) og  $m/z = 471,5$  og  $706,8$  (NLLGLIEAKacENR) ble avlest. Forholdet mellom  $m/z = 485,8$  og ( $m/z = 471,5$  og  $706,8$ ) ble beregnet, og konsentrasjon av ProGRP ble forsøkt fastslått ut fra kalibreringskurven.

### 5.12. Evaluering av metoden

#### 5.12.1. Linearitet

LC-MS-metodens linearitet ble testet med syv ProGRP (31-98)-konsentrasjoner i området 0,6 µg/mL-12 µg/mL. Korrelasjonskoeffisienten,  $R^2$ , ble beregnet for hver kurve.

#### 5.12.2. Ukjente prøver

To rør med 200 µL plasma ble tilsatt en, for operatøren, ukjent mengde ProGRP (31-98). Prøvene ble deretter tilsatt intern standard og opparbeidet beskrevet i avsnitt 5.3. Intensitetene til signalene til de ukjente prøven ble registrert og konsentrasjonen ble beregnet ut fra kalibreringskurven. Deretter ble de virkelige konsentrasjonene kjent. Disse forsøkene ble gjort for å et inntrykk hvor nøyaktig og presis metoden var.

#### 5.12.3. Repeterbarhet

LC-MS-metodens repeterbarhet ble testet ved at det ble analysert 4 paralleller av to ProGRP (31-98)-løsninger på henholdsvis 1,2 µg/mL og 2,4 µg/mL i samme analyserekke. Disse konsentrasjonene ble valgt fordi de ligger i midtre del av kalibreringskurven. Relativt standardavvik (RSD) for topphøyde og retensjonstid ble beregnet.

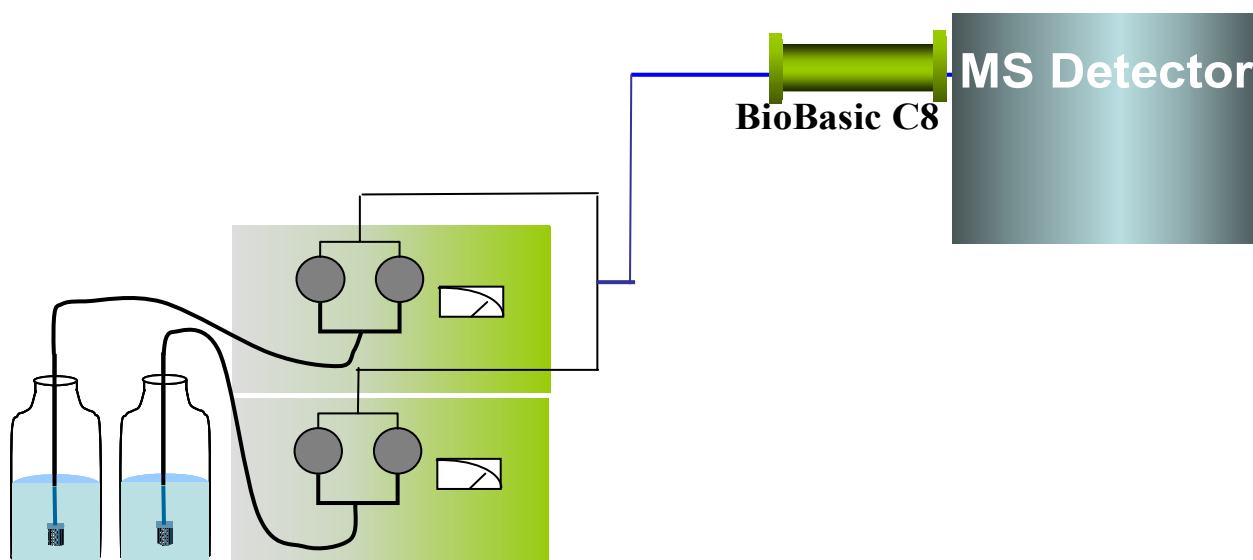
#### 5.12.4. Deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ)

Deteksjons- og kvantifiseringsgrensen for ProGRP (31-98) i plasma ble beregnet ut fra en spiket prøve på 0,6 µg/mL. LOD ble beregnet ut fra S/N forhold på 1:3, og LOQ ble beregnet ut fra S/N forhold på 1:10.

### 5.13. Oppsett av apparatur

#### 5.13.1. Oppsett av LC-MS for vandige prøver

Instrumentene ble satt opp som vist i figur 5.1. Systemet bestod av mobilfasereservoar, pumper, blandekammer, autoinjektor, kolonne og MS.

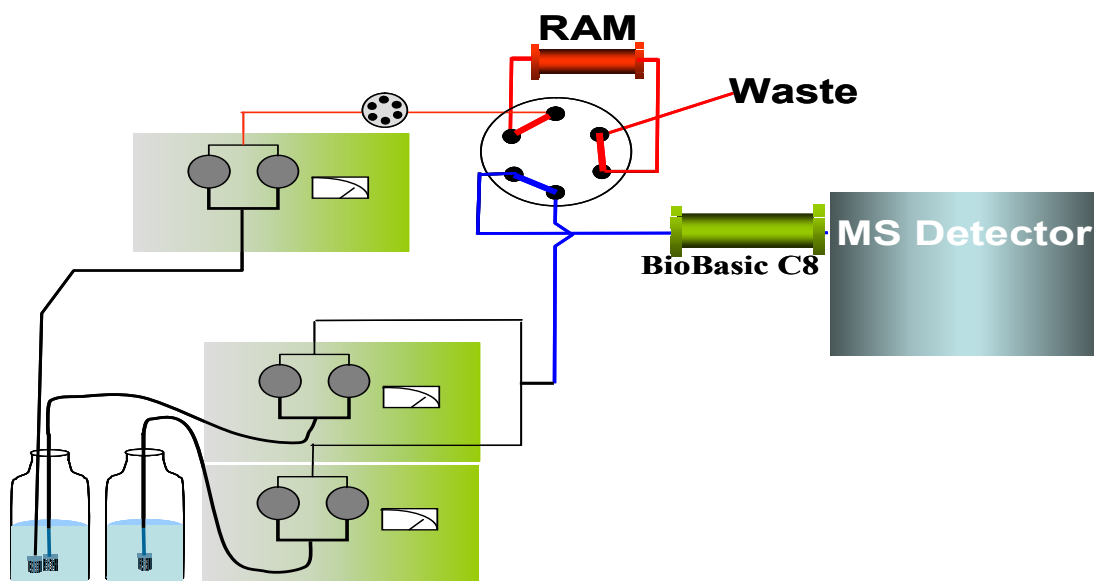


Figur 5.1: Oppsett av LC-MS for vandige prøver

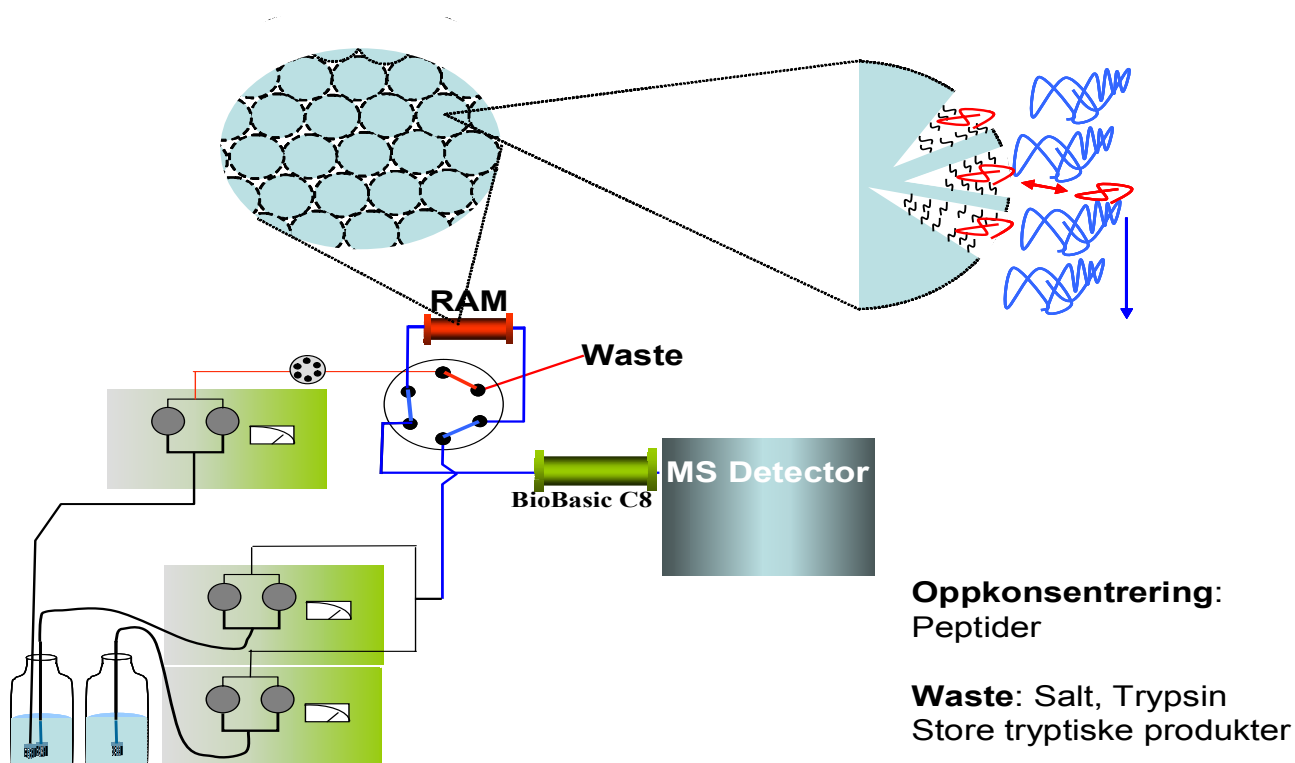
#### 5.13.2. Oppsett av LC-MS for plasmaprøver

Systemet bestod av mobilfasereservoar, pumper, blandekammer, autoinjektor, switch, RAM-analysekolonne, loading pumpe, analysekolonne og MS. Ved analyse av plasmaprøver ble instrumentene satt opp som vist i figur 5.2 og figur 5.3. Det ble benyttet en C8-RAM kolonne for oppkonsentrering av peptider, samt for å skille ut salter, uklippede proteiner og trypsin. I posisjon 0 (figur 5.2) festes ønskede peptider seg til RAM-kolonnen, mens store proteiner glir forbi den hydrofile ytre overflaten. Loading hastigheten var 0,5 mL/min. Ved switching til posisjon 1 (figur 5.3), går flowen andre veien slik at peptidene blir vasket av. Dette kalles "backflushing". Prøven

kan, etter både proteinfelling og LC-integrert prøveoppbeidelse på RAM-kolonne, analyseres på analytisk kolonne.



Figur 5.2: Oppsett av LC-MS for plasmaprøver i posisjon 0



Figur 5.3: Oppsett av LC-MS for plasmaprøver i posisjon 1

### 5.14. Mobilfasehastighet

Mobilfasehastighetene for BioBasic C-8 kolonnen ble bestemt ut fra produktinformasjon og etablerte metoder på kolonnen.

Under analyse: 0,05 mL/min

Under kondisjonering av kolonnen: 0,08 mL/min

### 5.15. Gradientprogrammer

Analyser av plasmaprøver ble utført med et gradientprogram som vist i tabell 5.6.

*Tabell 5.6: Gradientprogram for deteksjon av peptider/produkter i plasma*

| Tid (min) | Flowhastighet (mL/min) | Mobilfase A (%) | Mobilfase B (%) | Switch-posisjon |
|-----------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 1         | 0,08                   | 95              | 5               | 0               |
| 12        | 0,05                   | 95              | 5               | 0               |
| 14        | 0,05                   | 95              | 5               | 1               |
| 29        | 0,05                   | 60              | 40              | 1               |
| 34        | 0,05                   | 60              | 40              | 1               |
| 43        | 0,05                   | 40              | 60              | 1               |
| 43.1      | 0,05                   | 0               | 100             | 1               |
| 44.5      | 0,05                   | 0               | 100             | 0               |
| 45        | 0,08                   | 0               | 100             | 0               |
| 45,5      | 0,08                   | 95              | 5               | 0               |
| 60        | 0,05                   | 95              | 5               | 0               |

Analyser av vandige prøver ble utført med et gradientprogram som vist i tabell 5.7.

Tabell 5.7: Gradient program for deteksjon av peptider/produkter i vandige prøver

| Tid (min) | Hastighet (mL/min) | Mobilfase A (%) | Mobilfase B (%) |
|-----------|--------------------|-----------------|-----------------|
| 1         | 0,05               | 95              | 5               |
| 16        | 0,05               | 60              | 40              |
| 21        | 0,05               | 60              | 40              |
| 30        | 0,05               | 40              | 60              |
| 42        | 0,05               | 95              | 5               |

## 5.16. Deteksjon

MS ble brukt til deteksjon av peptidene og peptidproduktene (se tabell 5.8 for m/z-verdier). MS betingelsene var som følger; tørkegass (N<sub>2</sub>) mellom 10 L/min - 20 L/min, nebulisator gass (N<sub>2</sub>) 1,5 L/min, CDL temperatur 200 °C, blokk temperatur 200 °C og probespenning: 4,5 kV. Ved deteksjonen ble det brukt en enkel kvadrupol som masseanalysator. ESI kilden opererte i positiv ioniserings modus. For å unngå unødvendige forurensinger i detektoren fra plasmaprøver, ble de første og de siste 15 minuttene av prøvene ikke detektert.

Tabell 5.8: m/z-verdier for peptider og peptidprodukter som er brukt i oppgaven.

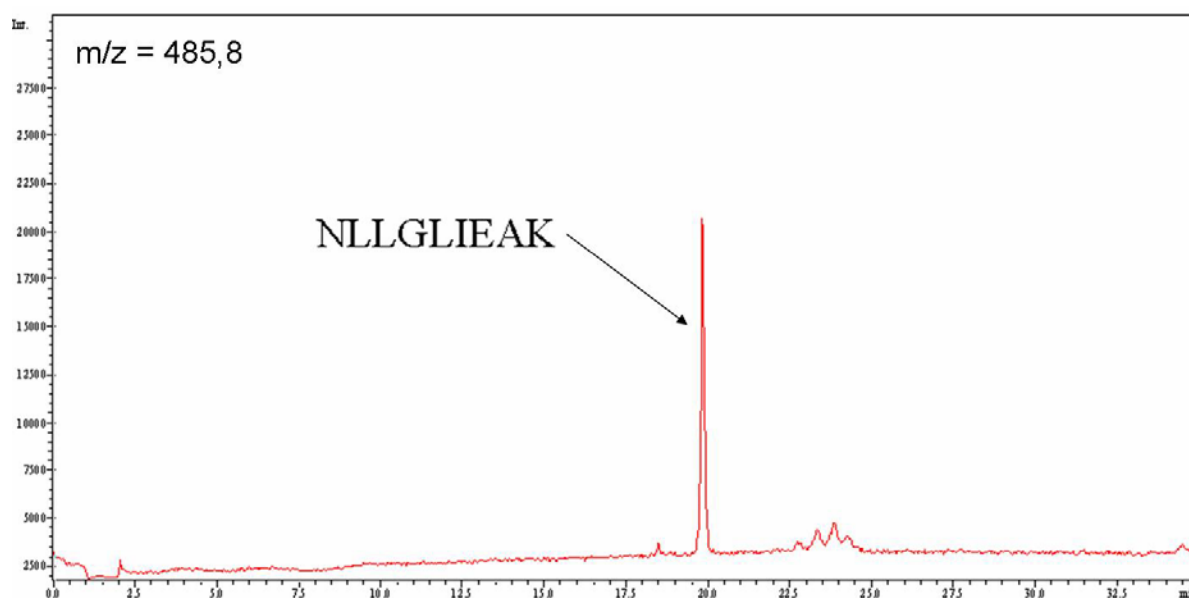
| Peptid og peptidprodukter                  | [M+H] <sup>+</sup> | [M+2H] <sup>2+</sup> | [M+3H] <sup>3+</sup> |
|--|--------------------|----------------------|----------------------|
| NLLGLIEAK (ProGRP (31-98))                 |                    | 485,8                |                      |
| NLLGLIEAKacENR (Acetylt<br>ProGRP (31-98)) |                    | 706,8                | 471,5                |
| NT 1-8                                     | 1031,2             | 516,1                |                      |
| Acetylt NT 1-8                             |                    | 537,1                |                      |

## 6. Resultater og diskusjon

### 6.1 Innledende forsøk

#### 6.1.1. Analyse av ProGRP (31-98)

Det ble i første del av oppgaven utført analyser av ProGRP (31-98) i vandig miljø. ProGRP (31-98) ble klippet med trypsin og produktene ble analysert på LC-MS. Figur 6.1. viser et typisk kromatogram hvor deteksjonen var innstilt på SIM-mode på verdien  $m/z = 485,8$  (NLLGLIEAK).



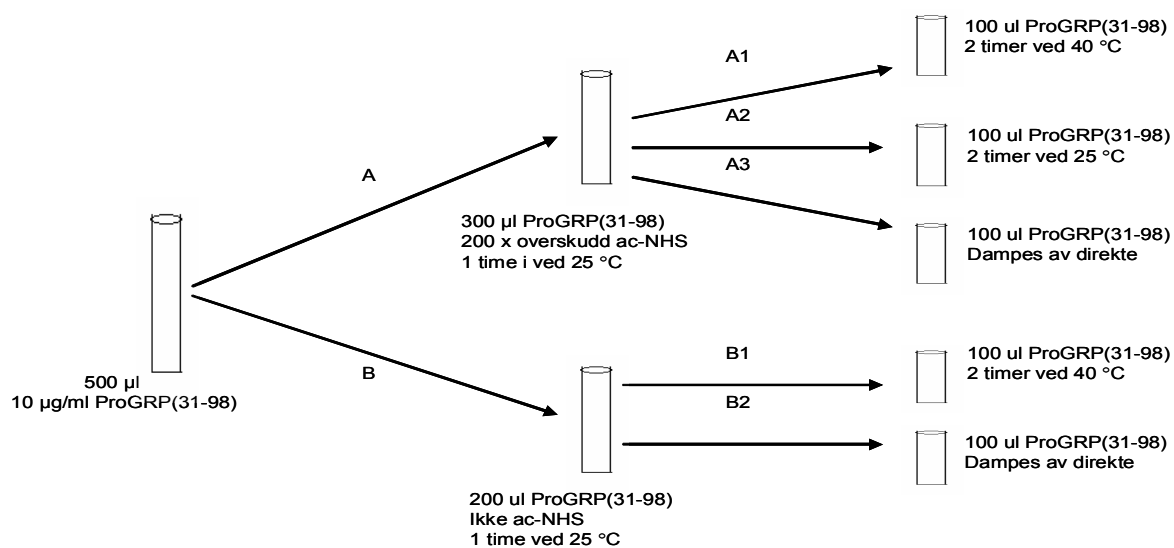
Figur 6.1: Kromatogram som viser  $m/z = 485,8$  (NLLGLIEAK).

Det ble også analysert prøver av ProGRP (31-98) i scan-mode (resultater ikke vist). Analysene viste at  $m/z = 485,8$  var det signalet med høyest intensitet. Dette er i overensstemmelse med tidligere arbeid (11).

## 6.2. Acetylering med ac-NHS

### 6.2.1. Innledende forsøk med ac-NHS estere

Betingelsene for acetylering med ac-NHS var ukjente med tanke på mengde, temperatur, pH, stabilitet og reaksjonstid. De første forsøkene ble utført i vandig, basisk miljø (pH = 8,5)

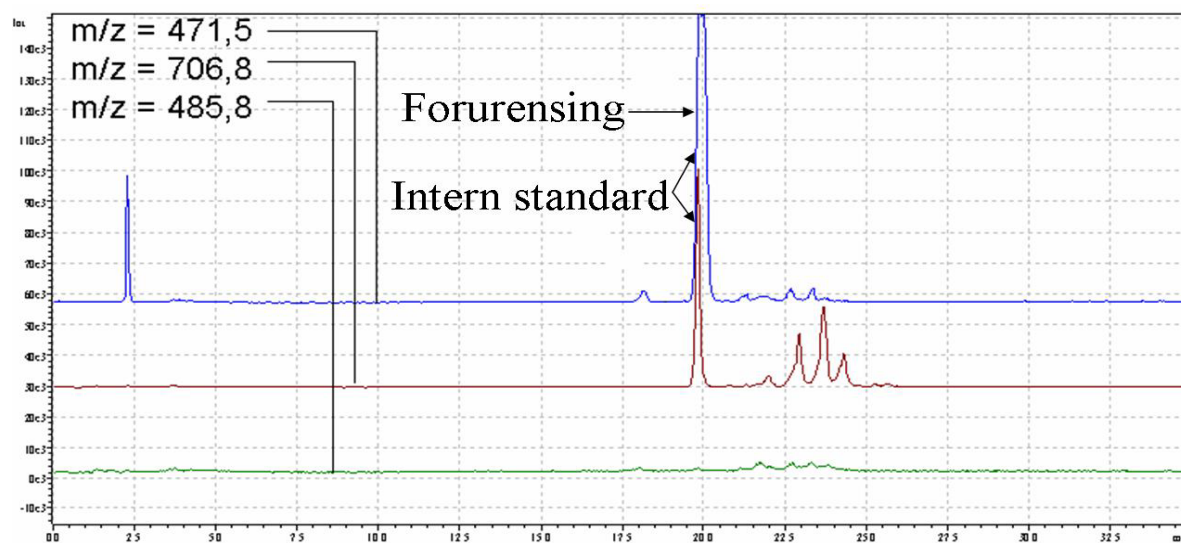


Figur 6.2: Forsøksoppsett over acetyleringsreaksjoner med ulike betingelser.

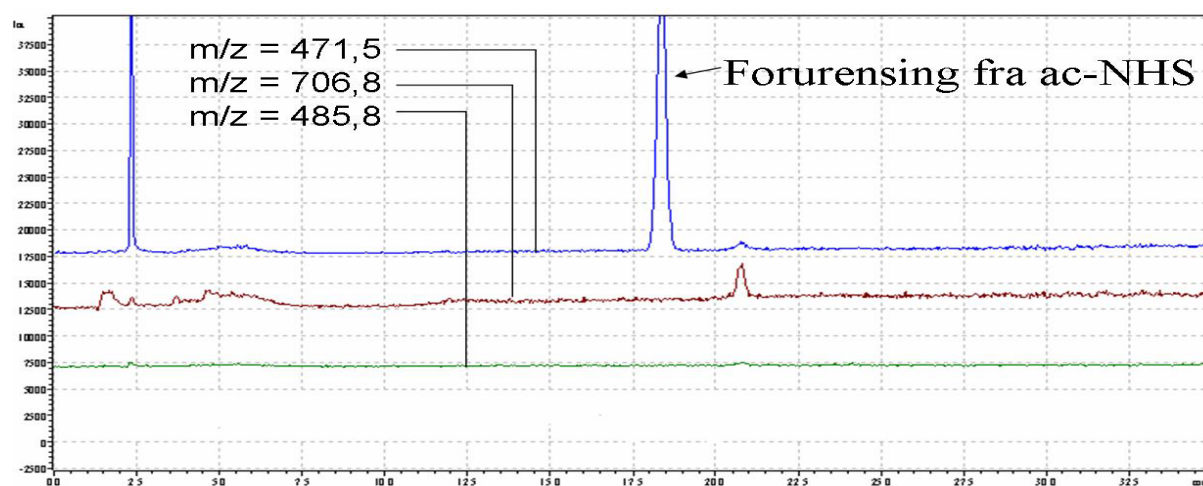
Figur 6.2 viser de innledende forsøkene ved bruk av ac-NHS. Det ble laget 500 µL 10 µg/mL ProGRP (31-98) som ble splittet i henholdsvis 300 µL (A) og 200 µL (B). Rør A ble tilsatt 200 x overskudd ac-NHS, hvor mengden ble beregnet som vist i avsnitt 5.7. Reaksjonen stod i romtemperatur i en time. Rør B ble ikke ac-NHS, men stod like lenge som rør A i romtemperatur. Rør B fungerte som en kontroll for rør A. Etter at acetyleringsreaksjonen var ferdig, ble rør A splittet til tre nye rør på 100 µL. Hensikten med dette trinnet var å inaktivere ac-NHS etter acetyleringen. Ac-NHS er labilt og ulike metoder ble benyttet for å prøve å ødelegge aktiviteten. Det er viktig at intern standarden ikke inneholder aktivt ac-NHS når den tilsettes en pasientprøve. Sannsynligheten for at ac-NHS vil bruke seg selv opp ved å acetylere lysin og N-terminaler på plasmaproteiner er stor. Det er likevel en mulighet for at ProGRP i pasientprøven kan bli acetylet, og dette vil kunne interferere med kvantifiseringen.



Det er derfor ønskelig å inaktivere ac-NHS etter endt acetylering. Rør A1 stod 2 timer ved 40 °C, rør A2 stod ved romtemperatur i 2 timer før inndamping, og rør A3 ble dampet direkte av etter at acetyleringsreaksjonen var ferdig. B1 ble behandlet likt som rør A1, mens B2 ble behandlet på samme måte som rør A3. Etter inndamping av A1-A3 og B1-B2, ble innholdet reløst i 100 µL TEA. Det ble deretter tilsatt trypsin i forhold 1:20, inkubert i 24 timer ved 37 °C og analysert på LC-MS.

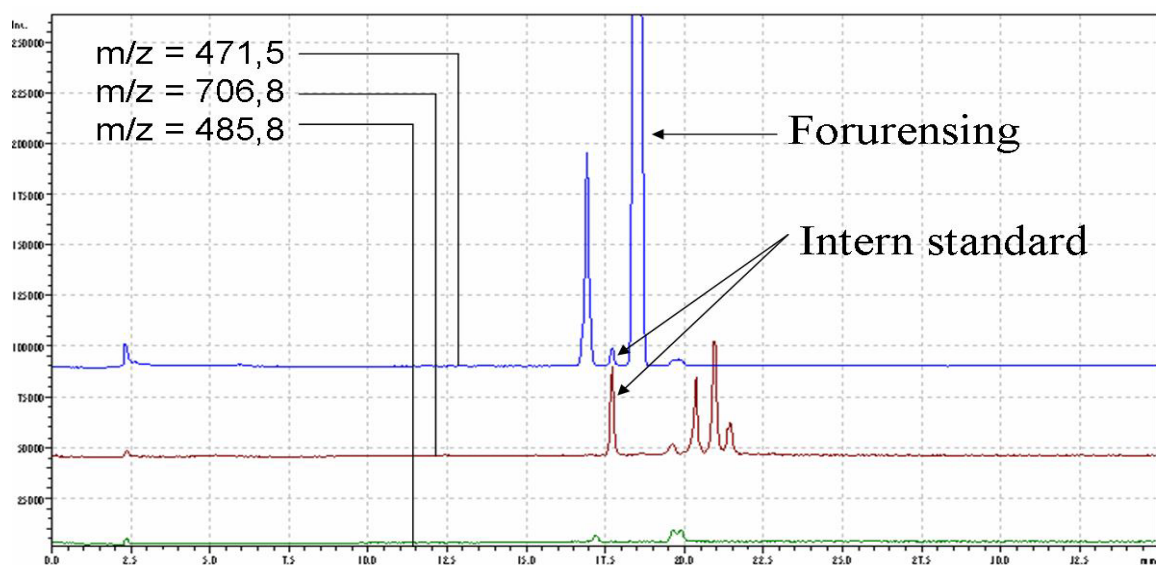


Figur 6.3: Kromatogram av prøve A1.

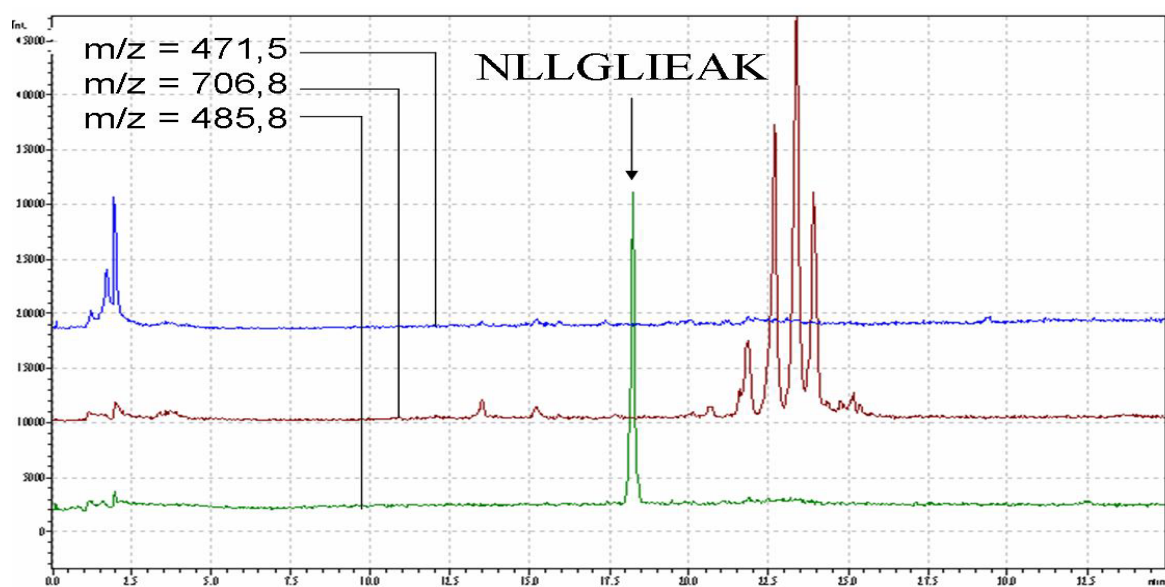


Figur 6.4: Kromatogram av injeksjon av kun ac-NHS.

Kromatogrammene viste en forurensing som co-eluerte med acetyleringsproduktet. Denne toppen er trolig en forurensing fra ac-NHS, da injeksjon av kun ac-NHS ga det samme signalet (figur 6.4), samt at kromatogrammene til prøve B1 og B2 ikke hadde dette signalet. Figur 6.3 er et typisk kromatogram fra prøve A1-A3. Intern standarden ( $m/z = 706,8$  og  $471,5$ ) co-eluerte med forurensingen fra ac-NHS. Kvantifiseringen av ProGRP (31-98) baserte seg på topphøydene til intern standarden, og en co-eluering vil kunne interferere med intensitetene til intern standarden. Det var derfor ønskelig å separere forurensingen og intern standard. Problemet med co-eluering ble løst ved å legge om til en flat gradient ved elueringstidspunktet til intern standarden. En acetylert prøve ble deretter analysert på nytt med den nye gradienten, noe som ga grunnlinjeseparasjon av forurensing og intern standard (figur 6.5). Kromatogrammene viste signal for  $m/z = 706,8$  og  $471,5$  som hadde en noe lengre retensjonstid enn NLLGLIEAK ( $m/z = 485,8$ ). Dette var trolig acetyleringsprodukter, da B1 (figur 6.6) og B2 ikke hadde de samme signalene. For å verifisere aminosyresekvensen til  $m/z = 706,8$  og  $471,5$ , ble det utført en LC-MS/MS-analyse med fragmentering.



Figur 6.5: Kromatogram av acetylert prøve med flatere gradient.



Figur 6.6: Kromatogram av prøve B1.

### 6.2.2. Verifisering av acetyleringsprodukt med LC- MS/MS

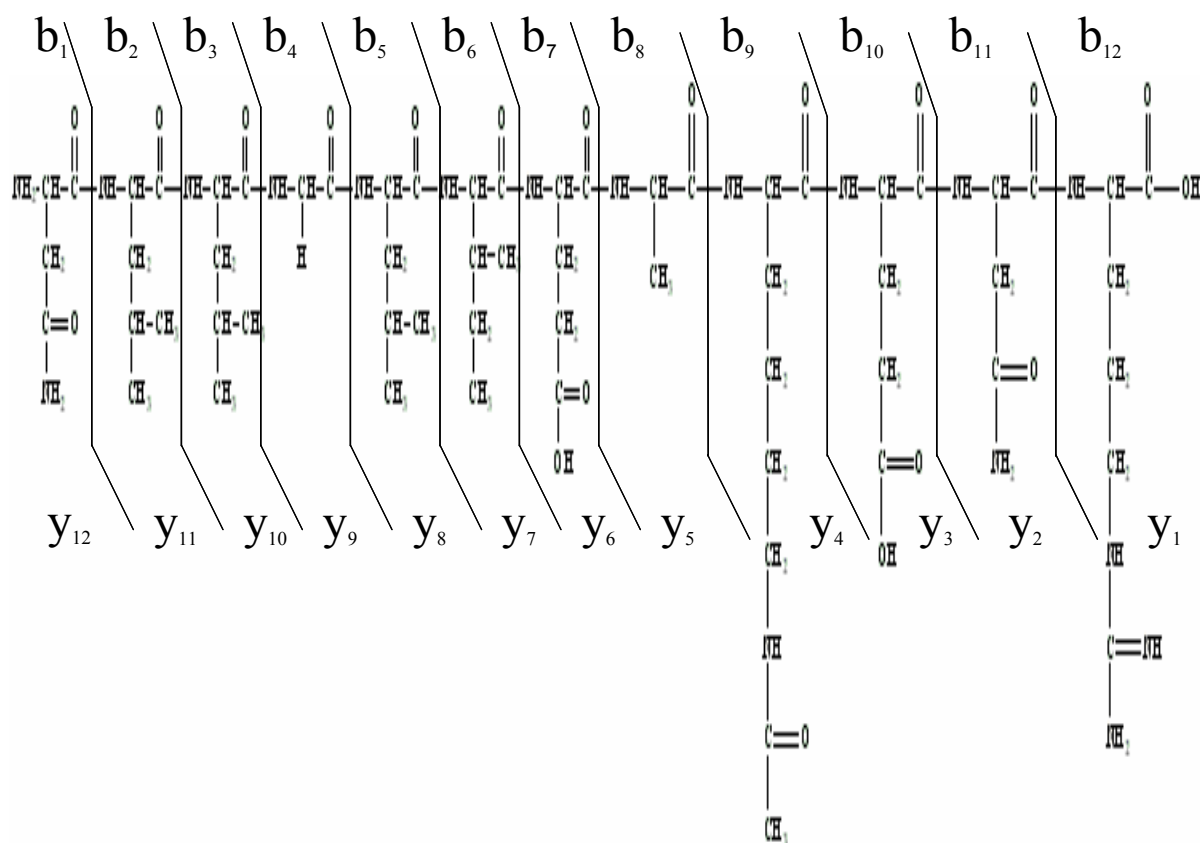
Signalene ( $m/z = 471,5$  og  $706,8$ ) ved  $t_r = 17,5$  minutter (med den nye gradienten) ble analysert på LC-MS/MS for å verifisere acetyleringsproduktene. Produktverifiseringen ble gjort med en ionefelle MS/MS. Det ble generert in silico fragmenteringer og tabell 6.1 viser de teoretiske b- og y-ionene og observerte b- og y-ioner fra analysen

*Tabell 6.1: Oversikt over teoretiske og observerte b- og y- ioner fra produktverifiseringen*

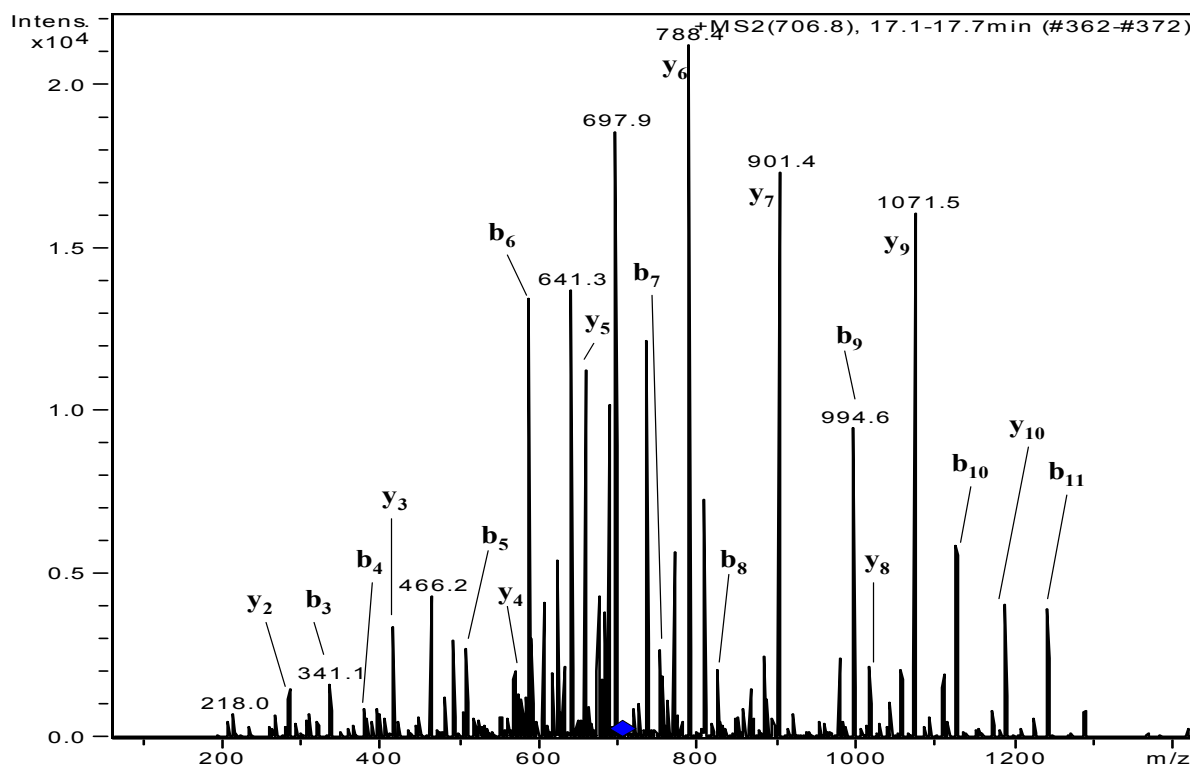
| Teoretiske b-ioner | Observerte b-ioner | Teoretiske y-ioner | Observerte y-ioner |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                    |                    | $y_1 = 175,1$      |                    |
| $b_2 = 228,1$      |                    | $y_2 = 289,1$      | $y_2 = 289,0$      |
| $b_3 = 341,2$      | $b_3 = 341,1$      | $y_3 = 418,2$      | $y_3 = 418,1$      |
| $b_4 = 398,2$      | $b_4 = 398,1$      | $y_4 = 588,3$      | $y_4 = 588,3$      |
| $b_5 = 511,3$      | $b_5 = 511,2$      | $y_5 = 659,3$      | $y_5 = 659,3$      |
| $b_6 = 624,4$      | $b_6 = 624,3$      | $y_6 = 788,4$      | $y_6 = 788,4$      |
| $b_7 = 753,4$      | $b_7 = 753,4$      | $y_7 = 901,4$      | $y_7 = 901,4$      |
| $b_8 = 824,4$      | $b_8 = 824,4$      | $y_8 = 1014,5$     | $y_8 = 1014,5$     |
| $b_9 = 994,6$      | $b_9 = 994,6$      | $y_9 = 1071,5$     | $y_9 = 1071,5$     |
| $b_{10} = 1123,6$  | $b_{10} = 1123,5$  | $y_{10} = 1184,6$  | $y_{10} = 1184,6$  |
| $b_{11} = 1237,6$  | $b_{11} = 1237,5$  | $y_{11} = 1297,7$  |                    |

Resultatene viste at så godt som alle b- og y- ioner av produktet NLLGLIEAKacENR samsvarer med de teoretiske fragmentene til produktet. Fragmentionene  $b_3$ - $b_{11}$  og de komplementære y- ionene  $y_2$ -  $y_{10}$  ble observert. Det ble også observert b- og y- ioner med tap av  $H_2O$  og  $NH_3$  som samsvarte med teoretiske verdier (resultat ikke vist), noe som styrket resultatet. Figur 6.7 viser fragmenteringen av NLLGLIEAKacENR til b- og y-ioner, og figur 6.8 viser MS/MS-spekteret av 2-ganger ladet molekyl (NLLGLIEAKacENR). De åtte første aminosyrene i intern standarden er identisk med det spesifikke tryptiske klipproduktet fra

ProGRP (31-98), NLLGLIEAK. Dermed skal  $b_1$ - $b_8$ -ionene fra LC-MS/MS-analysen av NLLGLIEAK, vist i figur 4.10, være identisk med  $b_1$ - $b_8$ -ionene fra LC-MS/MS-analysen av NLLGLIEAKacENR. Dette er også tilfelle. Acetylgruppen er festet på aminosyre nummer 9 (K) på intern standarden, og dette  $b_9$ -ionet vil derfor ha en masse + 42 mer enn det teoretiske  $b_9$ -ionet til NLLGLIEAK (figur 4.10). Det teoretiske  $b_9$ -ionet av NLLGLIEAK har en masse/ladning på 952,6, mens  $b_9$ -ionet vist i figur 6.7 har en masse/ladning på 994,6 (se tabell 6.1). Dette gir en differanse på 42, noe som verifiserer at aminosyren lysin er acetylt. På grunnlag av LC-MS/MS resultatene ble aminosyresekvensen til intern standarden verifisert til NLLGLIEAKacENR.



Figur 6.7: Kollisjonsindusert fragmentering av NLLGLIEAKacENR som viser  $b$ - og  $y$ -ioner.



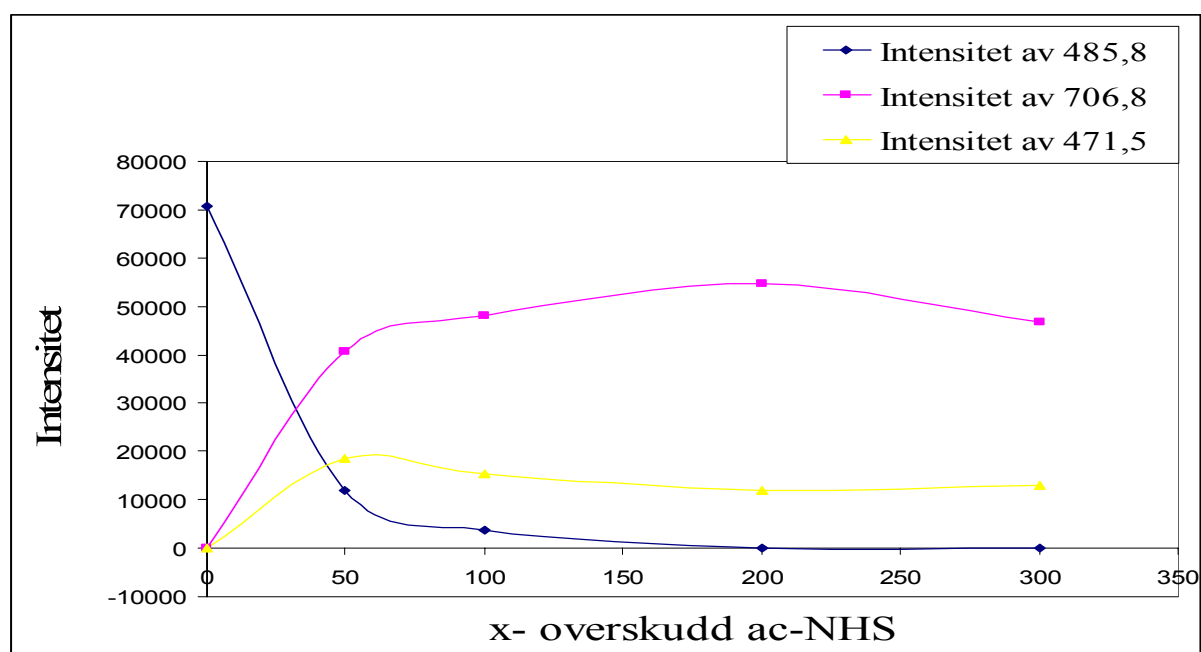
Figur 6.8: MS/MS-spekter etter fragmentering av *NLLGLIEAKacENR*.

### 6.2.3. Tids- og mengdeaspekt ved acetyleringsreaksjoner

Som et ledd i optimaliseringen av acetyleringsreaksjonen ble det utført forsøk for å undersøke hvilken reaksjonstid, samt hvilken ac-NHS-mengde som var optimal. Det ble pipettert ut 100 µL av en ProGRP (31-98)-løsning med konsentrasjon 10 µg/mL til 9 eppendorfrør. Det ble deretter tilsatt ulike mengder acetyleringsreagens (se tabell 6.2). Prøvene ble dampet inn etter endt reaksjon og digestert som beskrevet i materialer og metoder.

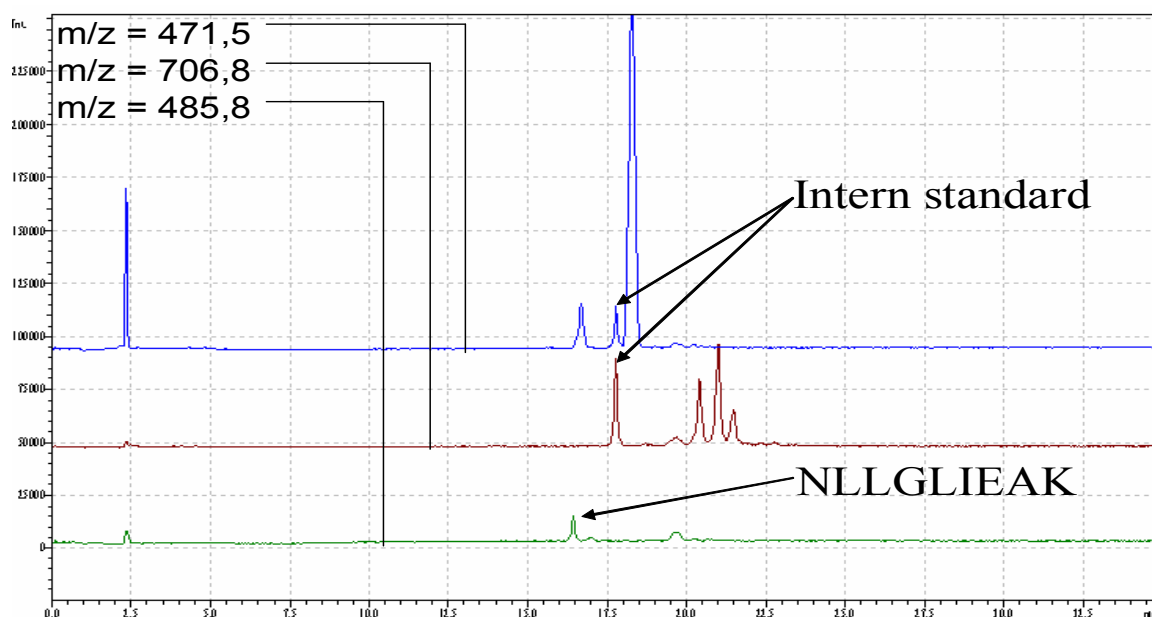
Tabell 6.2: Oversikt over rør, mengde ac-NHS og reaksjonstid i forbindelse med acetyleringsreaksjoner

| Rør | Mengde ac-NHS (x- overskudd) | Reaksjonstid (minutter) |
|-----|------------------------------|-------------------------|
| 1   | 200                          | 0 (dampet av direkte)   |
| 2   | 200                          | 20                      |
| 3   | 200                          | 40                      |
| 4-1 | 50                           | 60                      |
| 4-2 | 100                          | 60                      |
| 4-3 | 150                          | 60                      |
| 4-4 | 200                          | 60                      |
| 4-5 | 300                          | 60                      |
| 5   | 200                          | 90                      |



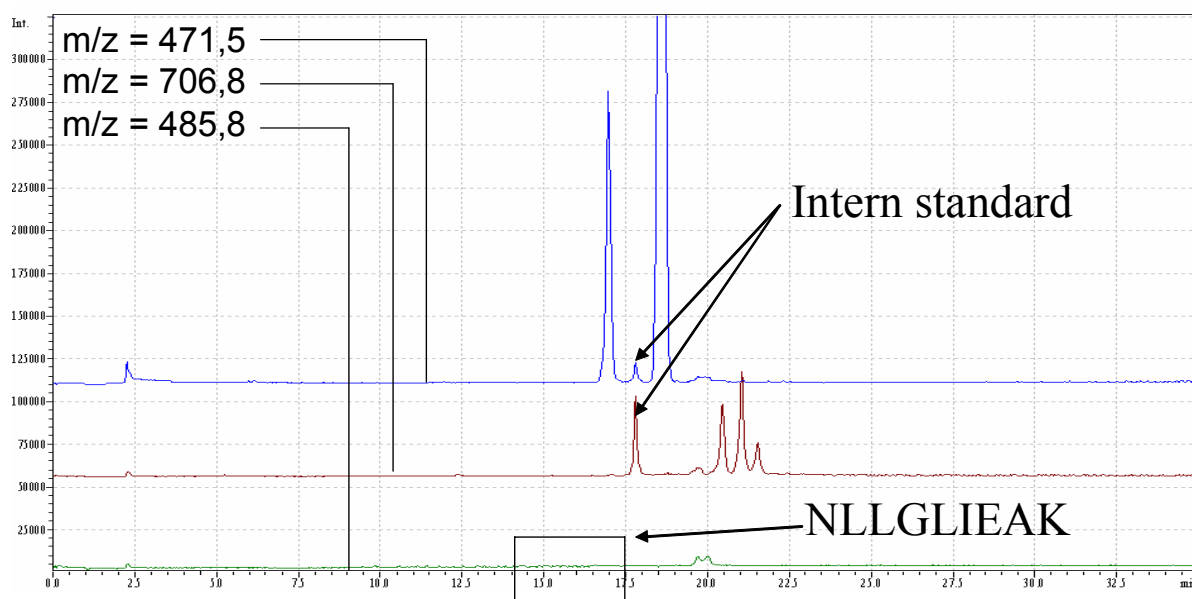
Figur 6.9: Kurve over ulike overskudd ac-NHS plottet mot intensiteter av produktene til ProGRP (31-98) og intern standard.

Figur 6.9 viser intensitetene av NLLGLIEAK ( $m/z = 485,8$ ) og det acetylte produktet NLLGLIEAKacENR ( $m/z = 706,8$  og  $471,5$ ) som funksjon av antall ganger overskudd ac-NHS. Figuren viser at ved 200- og 300 x overskudd ac-NHS er signalet fra  $m/z = 485,8$  (NLLGLIEAK) fraværende, noe som tydet på fullstendig acetylering. For å unngå for mye overskudd av ac-NHS ble 200 x overskudd acetyleringsreagens foretrukket i metoden. Figuren viser også at verken 50 eller 100 x overskudd ac-NHS var tilstrekkelig for å oppnå fullstendig acetylering. Dette vises ved at  $m/z = 485,8$  (NLLGLIEAK) fortsatt er tilstedeværende. Acetyleringsreaksjonen viste seg å være rask, og en reaksjonstid på 60 minutter ble implementert i prosedyren. Figur 6.10 og figur 6.11 viser henholdsvis et kromatogram hvor acetyleringsreaksjonen ikke er fullstendig (tilstedeværelse av  $m/z = 485,8$ ) og en hvor reaksjonen er fullstendig (fravær av  $m/z = 485,8$ ).



Figur 6.10: Kromatogram av prøve 4-1 (se tabell 6.2), som viser en ikke-fullstendig acetylering.





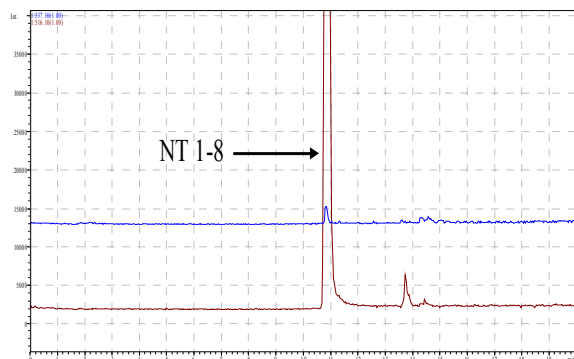
Figur 6.11: Kromatogram av prøve 4-4 (se tabell 6.2), som viser en fullstendig acetylering.

#### 6.2.4. Inaktivering av ac-NHS

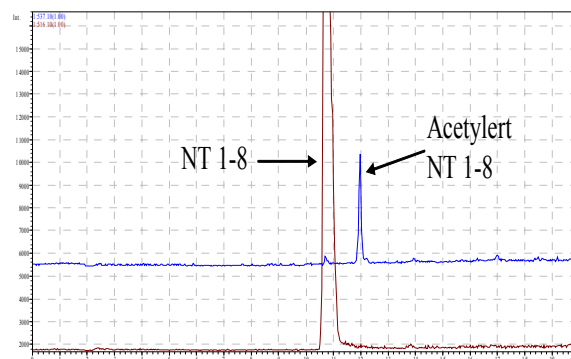
Det ble forsøkt ulike metoder for å stoppe acetyleringsaktiviteten til ac-NHS. Intensjonen var å utnytte den dårlige stabiliteten til derivatiseringsreagenset. Det første forsøket ble utført på følgende måte; 20  $\mu\text{L}$  ac-NHS ble, etter å ha stått i romtemperatur i 24 timer, tilsatt i 200 x overskudd til 100  $\mu\text{L}$  10  $\mu\text{g/mL}$  ProGRP (31-98). Prøven ble dampet inn, reløst i 100  $\mu\text{L}$  TEA og digestert over natten. Resultatet fra LC-MS-analysen viste signal for intern standarden, noe som indikerte at ac-NHS fortsatt var aktiv (appendiks). ProGRP (31-98) ( $m/z = 485,8$ ) var ikke tilstede, noe som i tillegg indikerte at acetyleringsreaksjon var fullstendig.

Da det forrige forsøket ikke førte til inaktivering av ac-NHS, ble det forsøkt å inaktivere acetyleringsreagenset ved å tilsette vann. Det ble tilsatt 10  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}$  til 40  $\mu\text{L}$  ac-NHS, som deretter ble stående ved romtemperatur i 48 timer. Hensikten var at  $\text{H}_2\text{O}$  skulle hydrolysere ac-NHS. Etter at ProGRP (31-98) var tilsatt 200 x overskudd av ac-NHS (tilsatt  $\text{H}_2\text{O}$ ), ble prøven dampet inn. Det ble deretter tilsatt trypsin, og prøven ble inkubert og analysert på LC-MS. Kromatogrammet viste signal for intern standard, men intensitetene var lavere enn forsøket beskrevet over (appendiks). Trolig har noe ac-NHS blitt hydrolysert, men hydrolyseaksjonen har ikke vært fullstendig. Stabiliteten til derivatiseringsreagenset viste seg å være bedre enn først antatt. Videre inaktiveringsforsøk ble utført på ferdig acetylte prøver (batcher).

For å kunne måle hvor mye ac-NHS som fortsatt var aktivt, ble et modellpeptid (NT 1-8) som inneholdt en acetylerbar gruppe (lysin) valgt til dette formålet. NT 1-8 ble analysert før og etter tilsetning av ac-NHS, og resultatet er vist i figur 6.12 og 6.13



Figur 6.12: Kromatogram av NT 1-8 uten ac-NHS-tilsetning.



Figur 6.13: Kromatogram av NT 1-8 tilsatt ac-NHS.

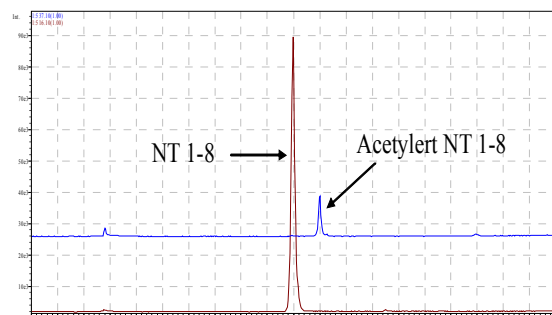
Figur 6.13 viser at NT 1-8 lot seg acetylere og dermed vil kunne fungere som et modellpeptid for inaktiveringsforsøkene.

For å se om ac-NHS fortsatt var aktiv etter endt acetyleringsreaksjon ble det utført et forsøk på følgende måte; 100  $\mu$ L ferdiglaget batch med intern standard ble blandet med 100  $\mu$ L NT 1-8 i et eppendorfrør. Røret ble satt til henstand i romtemperatur. Det ble deretter tatt ut prøver etter henholdsvis 30 og 60 minutter, og disse ble analysert på LC-MS. Resultatet av denne analysen viste at NT 1-8 ble acetykert av ac-NHS tilstede i batchen, og dermed at ac-NHS fortsatt var aktiv. Det ble forsøkt å inaktivere ac-NHS på flere måter. Det ble til 100  $\mu$ L intern standard (batch) tilsatt følgende reagenser:

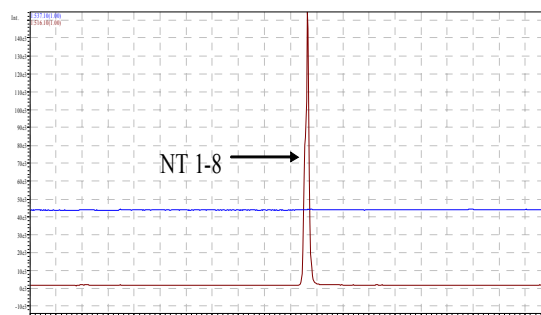
- 1) 100  $\mu$ L 0,1 M TEA. TEA er et amin og kan derfor teoretisk bli acetykert og på denne måten bruke opp ac-NHS.
- 2) 1  $\mu$ L 5 mg/mL Albumin. Dette proteinet inneholder mange acetylerbare grupper (lysin) og kan derfor bruke opp ac-NHS.
- 3) 100  $\mu$ L 12,5 %  $\text{NH}_3$ . Dette kan føre til basisk hydrolyse av ac-NHS.
- 4) Ingen tilsetning (blank).

Etter 60 minutters reaksjonstid ved romtemperatur, ble 100  $\mu$ L 1  $\mu$ g/mL NT 1-8 tilsatt alle prøvene. Denne reaksjonen gikk i nye 60 minutter. Deretter ble alle prøvene analysert på LC-MS. Resultatene viste at verken TEA eller albumin hadde evne til å inaktivere ac-NHS. NT 1-8 ble fortsatt acetykert i forsøk 1), 2) og 4). Figur 6.14 viser et typisk eksempel på NT 1-8-

acetylering etter disse forsøkene. Derimot medførte basisk hydrolyse av ac-NHS-esteren med  $\text{NH}_3$  i forsøk 3) at NT 1-8 ikke ble acetyleret. Det skyldes trolig at ac-NHS-esteren har blitt hydrolysert i det basiske miljøet (se figur 6.15).



Figur 6.14: Kromatogram av forsøk 1)



Figur 6.15: Kromatogram av forsøk 3)

### 6.2.5. Optimalisering av innaktiveringsmetode av ac-NHS med $\text{NH}_3$

Det ble i dette forsøket undersøkt hvor mye  $\text{NH}_3$ , samt hvor lang reaksjonstid, som var nødvendig for inaktivering av ac-NHS. Ulike mengder  $\text{NH}_3$  ble tilsatt til 100  $\mu\text{L}$  intern standard og reaksjonstiden ble variert for å få mest mulig informasjon om mengde og tid (se tabell 6.3 for betingelser).  $\text{NH}_3$  ble fortynnet 50:50 med vann til en konsentrasjon på 12,5 %.

Tabell 6.3: Oversikt over reaksjonstid og mengde  $\text{NH}_3$  tilsatt til 100  $\mu\text{L}$  intern standard

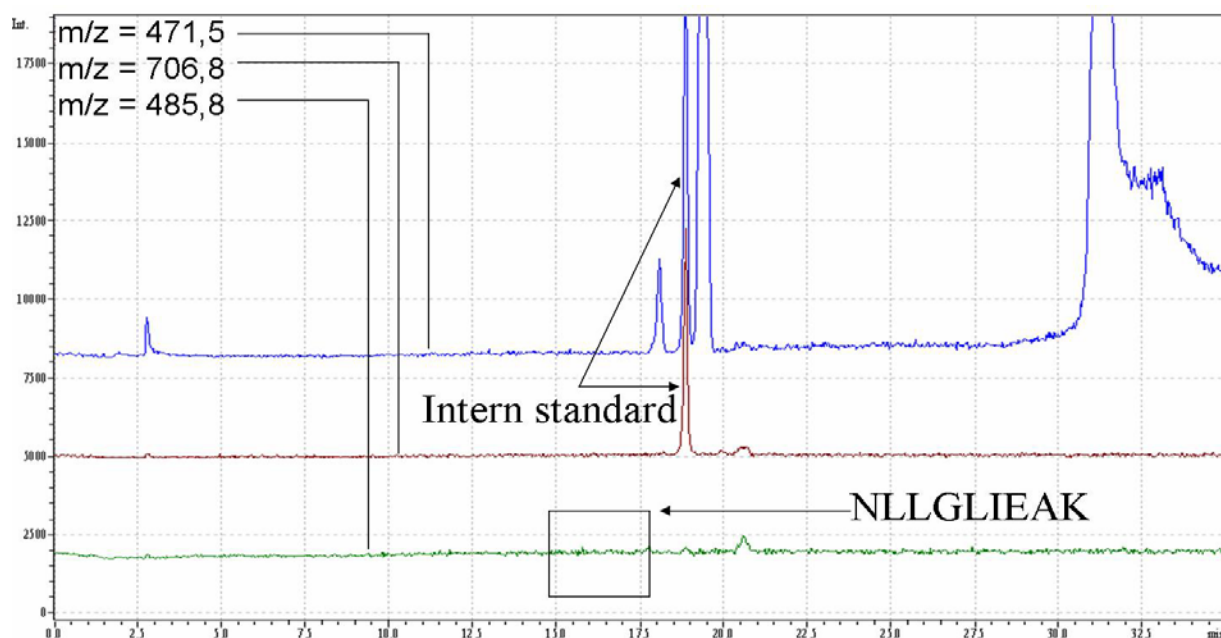
| Rør | Mengde 12,5 % $\text{NH}_3$ tilsatt ( $\mu\text{L}$ ) | Reaksjonstid (min) |
|-----|---|--------------------|
| A   | 5   | 60                 |
| B1  | 10  | 0                  |
| B2  | 10  | 20                 |
| B3  | 10  | 40                 |
| B4  | 10  | 60                 |
| C   | 15  | 60                 |
| D   | 20  | 60                 |

Etter reaksjonstiden, ble 100  $\mu\text{L}$  1  $\mu\text{g/mL}$  NT 1-8 tilsatt hver prøve. Denne reaksjonen tok 60 minutter. Prøvene ble analysert på LC-MS. Resultatene viste at 10  $\mu\text{L}$   $\text{NH}_3$  var tilstrekkelig for å inaktivere ac-NHS. Reaksjonen så ut til å være rask. Trypsin er et følsomt enzym som er

mest aktivt rundt fysiologisk pH, det vil si ved pH 7,3-7,5. Hvis pH synker til under 6 eller øker til over 8, vil enzymaktiviteten avta. Dette vil igjen føre til færre klippprodukter og unøyaktighet under kvantifiseringen. En metode som innebærer svært basiske forbindelser krever pH-kontroll. Dette gjelder både selve inaktiveringsreaksjonen, digestringen og før analyse i LC-MS. Dette problemet ble løst ved at det ble laget en stor mengde intern standard (batch) som ble justert til fysiologisk pH. Etter inaktivering med  $\text{NH}_3$ , ble pH justert til 7,5 med  $\text{HCOOH}$  under kontinuerlig pH-måling.

#### 6.2.6. Kontrollanalyse av intern standard (batch)

Utrekninger og tillaging av intern standard i større mengder (batch) er beskrevet i materialer og metoder. Resultatet av analysen for en standard kontrollanalyse er vist i figur 6.16. Ved tilstedeværelse av NLLGLIEAK, ble batchen forkastet da dette betyr at acetyleringsreaksjonen ikke har vært fullstendig. Fullstendig acetylering av intern standarden er viktig for å unngå feil i kvantifiseringen av en pasientprøve. Tilstedeværelse av NLLGLIEAK vil kunne summeres i tillegg til pasientens eget NLLGLIEAK, og kvantifiseringen vil ikke være pålitelig.



Figur 6.16: Kontrollanalyse som avdekket om acetyleringsreaksjonen var fullstendig eller ikke. NLLGLIEAK er her fraværende.

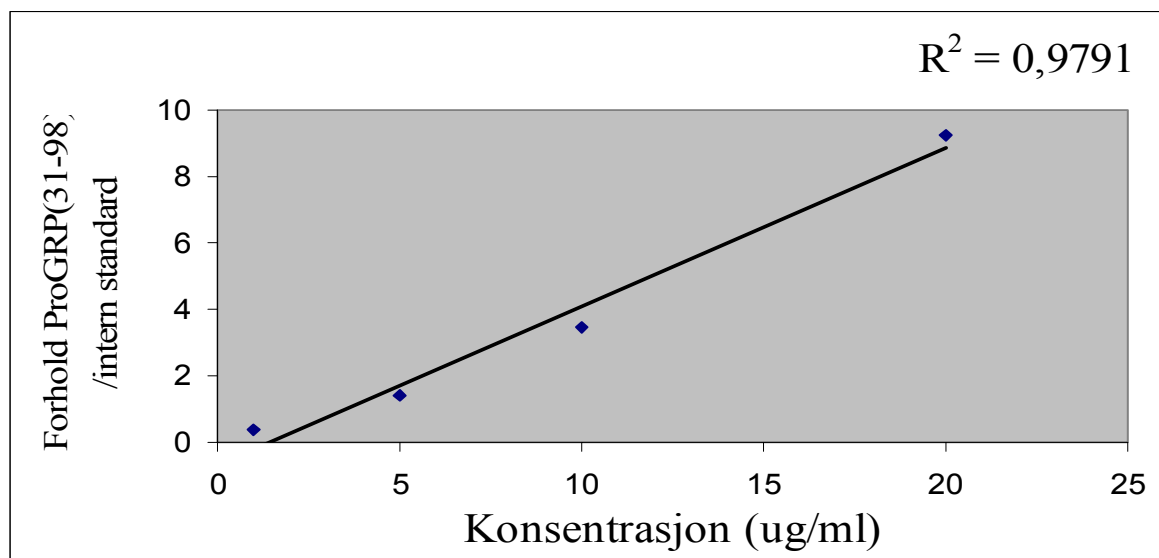
### 6.3. Kalibreringskurver i vandig miljø

#### 6.3.1. Kalibreringskurver med- og uten $\text{NH}_3$ tilsetning

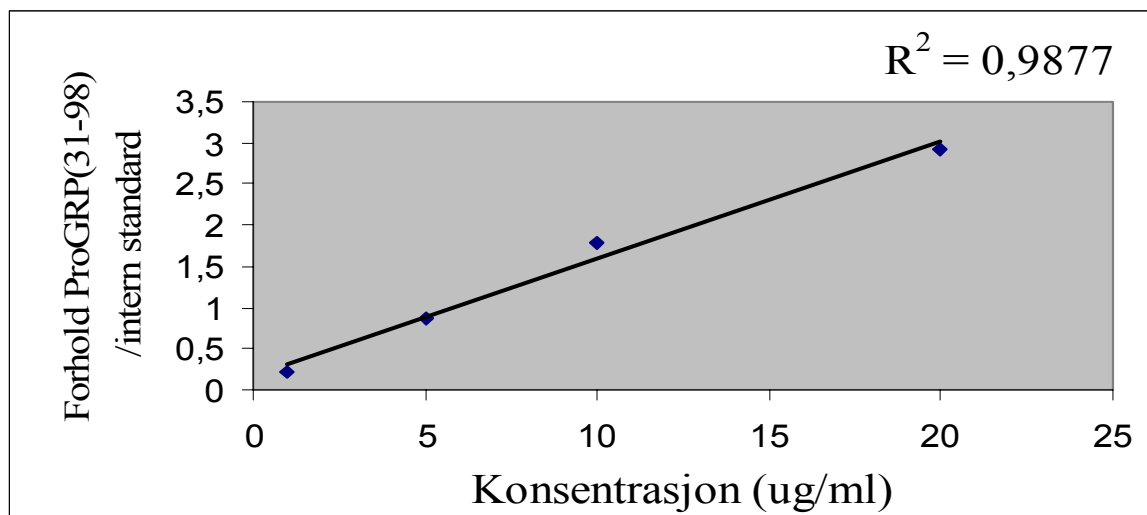
Det ble etablert kalibreringskurver i vandig miljø, både med- og uten  $\text{NH}_3$ -tilsetning. Tabell 6.4 viser forholdet mellom topphøyden til  $m/z = 485,8$  (ProGRP (31-98)) og summen av topphøydene til  $m/z = 706,8$  og  $471,5$  (intern standard).

Tabell 6.4: Forhold mellom topphøydene til ProGRP (31-98) ( $m/z = 485,8$ ) og 2- og 3 x ganger ladet intern standard ( $m/z = 706,8$  og  $471,5$ ) for kalibreringskurve 1 (uten  $\text{NH}_3$  tilsetning) og kalibreringskurve 2 (med  $\text{NH}_3$  tilsetning)

| Konsentrasjon | 1 $\mu\text{g/mL}$ | 5 $\mu\text{g/mL}$ | 10 $\mu\text{g/mL}$ | 20 $\mu\text{g/mL}$ |
|---------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| Kurve 1       | 0,365              | 1,400              | 3,44                | 9,24                |
| Kurve 2       | 0,221              | 0,875              | 1,78                | 2,98                |

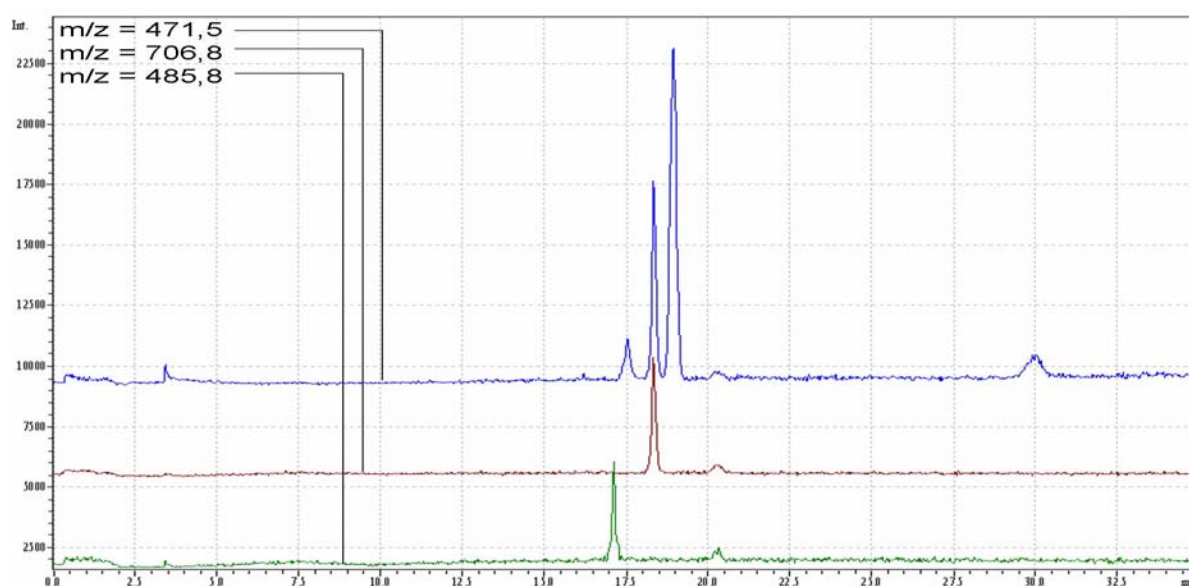


Figur 6.17: Kalibreringskurve 1, hvor batchen ikke har blitt tilsatt  $\text{NH}_3$ .



Figur 6.18: Kalibreringskurve 2, hvor batchen har blitt tilsatt  $\text{NH}_3$ .

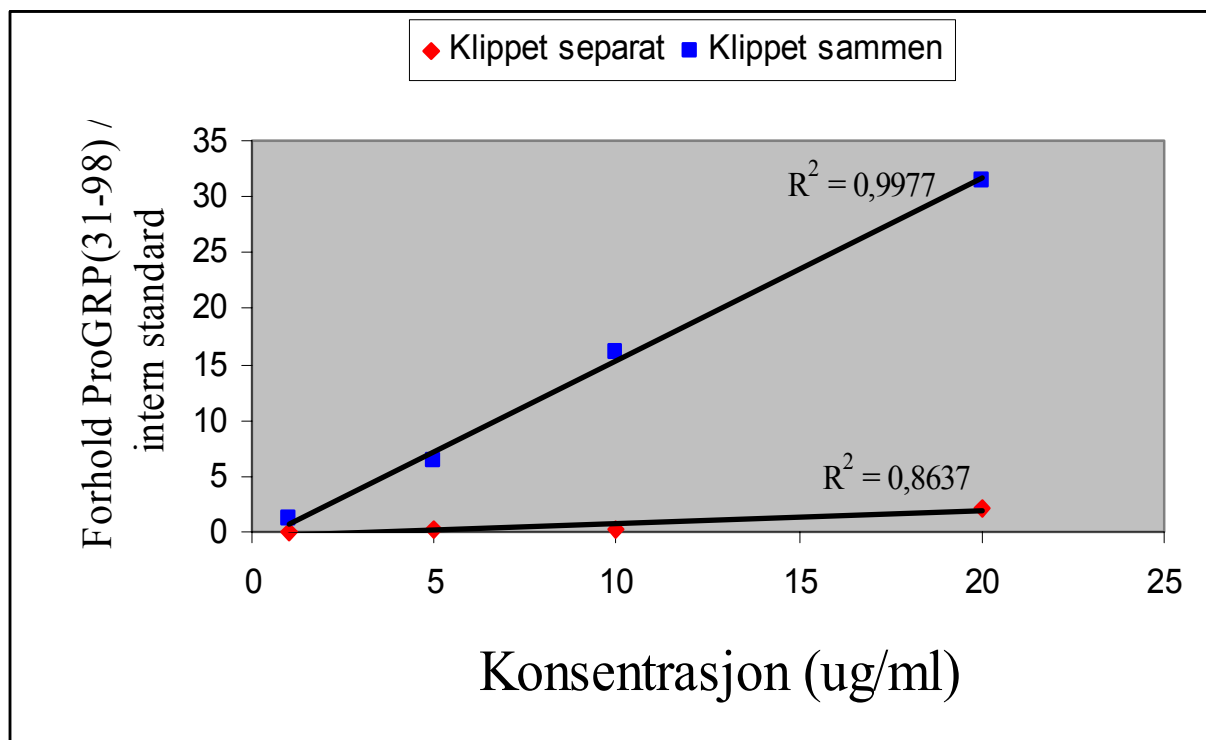
Kalibreringskurvene 1 (figur 6.17) og 2 (figur 6.18) viser en  $R^2$ -verdi på henholdsvis 0,979 og 0,987. Stigningstallene for kurvene er forskjellige, og dette skyldes at konsentrasjonen av intern standard ikke er identisk i begge tilfeller. Inaktiveringsreaksjonen fører til en fortynning av intern standarden på grunn av  $\text{NH}_3$ - og  $\text{HCOOH}$ -tilsetning. Viktigheten av inaktivert ac-NHS øker som nevnt i plasmaprøver/pasientprøver, da endogent ProGRP kan bli acetylt og dermed interferere med kvantifiseringen. Figur 6.19. viser et typisk kromatogram for kalibreringskurve 2.



Figur 6.19: Kromatogram av 5  $\mu\text{g/mL}$  ProGRP (31-98) fra kalibreringskurve 2.

### 6.3.2. Kalibreringskurve for ProGRP (31-98) og intern standard som klippes separat

Det ble også etablert kalibreringskurver hvor intern standarden og ProGRP (31-98) ble klippet opp med trypsin hver for seg og blandet etter digest. Disse kurvene ble sammenlignet med kurver hvor de to komponentene ble klippet sammen (figur 6.20). Hensikten med disse forsøkene var å vise hvor viktig det er å ha en intern standard som kan korrigere for variasjoner under tryptisk klipp.



Figur 6.20: Kalibreringskurve hvor intern standard og ProGRP (31-98) ble digestert med trypsin sammen (merket *blått*) og separat (merket *rødt*).

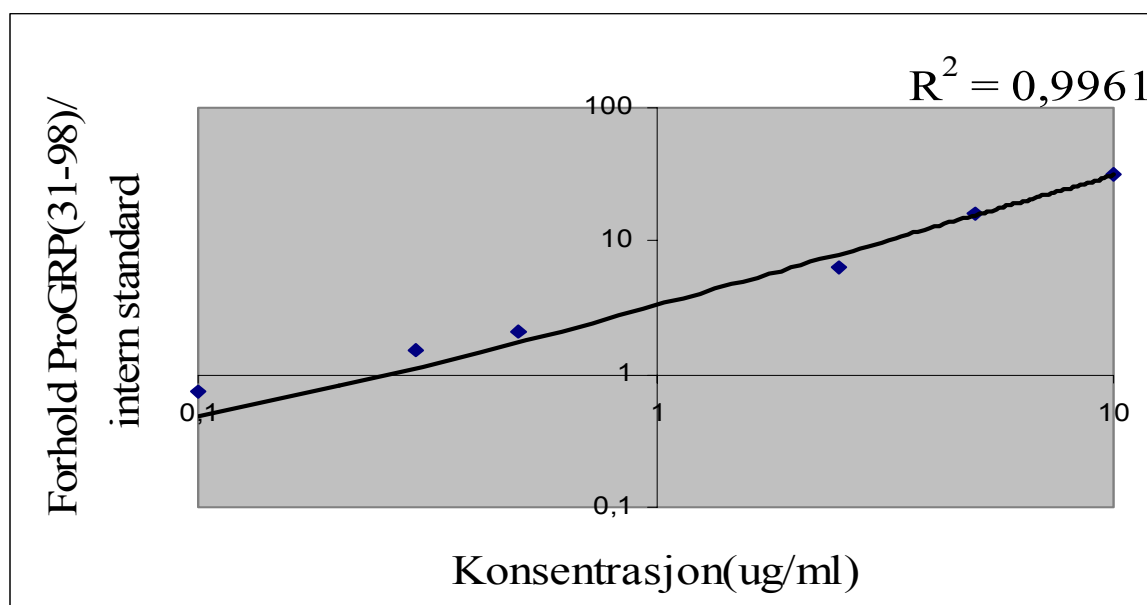
Kalibreringskurvene viser en  $R^2$ -verdi på henholdsvis 0,864 (klippet separat) og 0,998 (klippet sammen). Det er tydelig at innblanding av intern standard før det digesteres viser gode kalibreringskurver. Mange faktorer spiller inn i enzymatiske prosesser som tryptisk digest. Temperatur og kinetikk er eksempler på slike faktorer. Reproduserbar tryptisk klipp, det vil si identisk enzymaktivitet ved hvert forsøk, er noe som vanskelig lar seg gjøre. Ved å ha en intern standard som korrigerer for faktorer som spiller inn i tryptisk digest gjøres hele prosessen mer stabil og robust.

### 6.3.3. Kalibreringskurve med flere punkter og lavere ProGRP (31-98)-konsentrasjon

Det var ønskelig å detektere lavere konsentrasjoner av ProGRP (31-98). Det ble derfor etablert kalibreringskurver som inneholdt flere punkter og lavere konsentrasjoner enn tidligere. Tabell 6.5. viser en oversikt over konsentrasjoner, stoffmengde (mol), forhold mellom ProGRP (31-98) og intern standard, mengde O.C og stoffmengde O.C for kalibreringskurven vist i figur 6.21.

Tabell 6.5: Oversikt over konsentrasjoner, stoffmengde (mol), forhold mellom ProGRP (31-98) og intern standard, mengde O.C og stoffmengde O.C.

| Konsentrasjoner ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 0,1   | 0,3  | 0,5  | 2,5  | 5     | 10    |
|--------------------------------------|-------|------|------|------|-------|-------|
| Mol                                  | 0,03  | 0,09 | 0,15 | 0,75 | 1,5   | 3     |
| ProGRP (31-98)/<br>intern standard   | 0,749 | 1,53 | 2,11 | 6,41 | 15,98 | 31,47 |
| O.C (ng)                             | 2     | 6    | 10   | 50   | 100   | 200   |
| Mol O.C (pmol)                       | 0,26  | 0,78 | 1,3  | 6,5  | 12,9  | 25,9  |



Figur 6.21: Kalibreringskurve med flere- og lavere konsentrasjoner av ProGRP (31-98). (Begge aksene er i logaritmisk skala)



Kalibreringskurven viste en  $R^2$ -verdi på 0,996. Kurven er presentert i logaritmisk skala for å visualisere punktene bedre. Resultatet viste at lineariteten bevares over hele konsentrasjonsspekteret.

## **6.4. Plasmaprøver**

### **6.4.1. Innledende forsøk med plasmaprøver**

De innledende forsøkene tok sikte på å optimalisere og standardisere prøveoppbeidelsen og selve analysen. I starten ble et volum på 1000  $\mu\text{L}$  plasma benyttet som spikingsmatrix. Dette tilsvarer 80 mg protein, og siden injeksjonsvolumet var 20  $\mu\text{L}$ , medførte det at mengde protein injisert var 160  $\mu\text{g}$ . Dette er en svært stor mengde protein for det systemet som ble brukt i oppgaven. Faren ved å injisere så mye proteiner, er at systemet kan bli overladet. RAM-kolonnen skiller ikke mellom interessante og ikke-interessante proteiner, og det er derfor større sjanse for at de interessante proteinene kan forsvinne ut til waste. Dette fører igjen til lavere signal for de utvalgte produktene og høyere deteksjonsgrenser. De innledende forsøkene på plasmaprøver ble utført på følgende måte:

Fire rør, A-D, ble tilsatt:

A: 999  $\mu\text{L}$  plasma og 1  $\mu\text{L}$  1,2 mg/mL ProGRP (31-98)

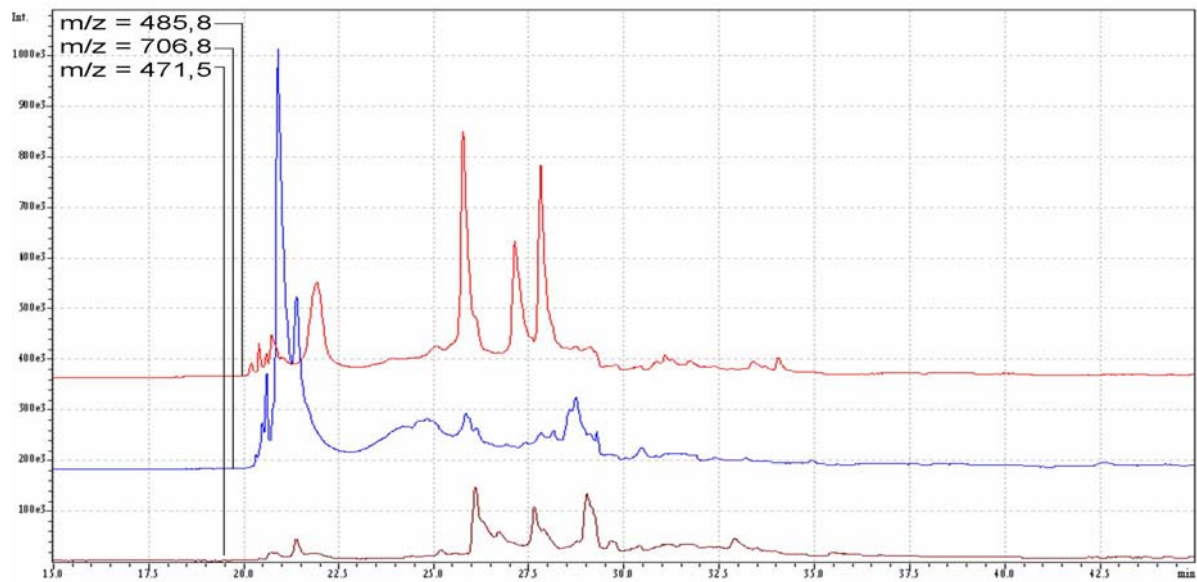
B: 990  $\mu\text{L}$  plasma og 10  $\mu\text{L}$  intern standard

C: 989  $\mu\text{L}$  plasma, 1  $\mu\text{L}$  1,2 mg/mL ProGRP (31-98) og 10  $\mu\text{L}$  intern standard

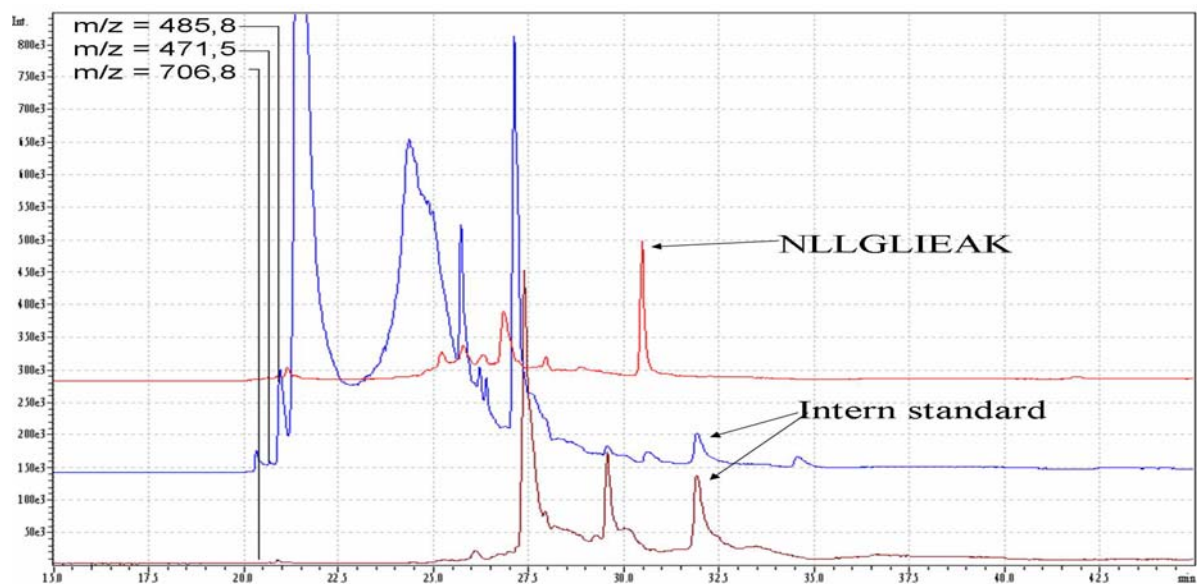
D: 1000  $\mu\text{L}$  plasma (blank)

Prøveoppbeidelsen og digesteringen ble utført som beskrevet i materialer og metoder. Resultatene av analyse av rør A-D viste at systemet trolig var overladet med proteiner. 1000  $\mu\text{L}$  plasma var derfor over grensen av hva systemet kunne tåle under disse forutsetningene og gjeldende prøveoppbeidelse. Figur 6.22 viser kromatogrammet av analyse av rør C. Verken NLLGLIEAK eller intern standard ble detektert. I tillegg til overlading av systemet, var bruk av trypsin alene trolig ikke godt nok for å sikre god nok klipp av peptidet. Startvolumet for plasmaprøver ble på grunn av dette justert til 200  $\mu\text{L}$  (se figur 6.23). På denne måten ble sannsynligheten for overlading av systemet redusert. Mengder med intern standard og trypsin ble endret når plasmavolumet ble endret.

Figur 6.22. og 6.23. viser forskjellen mellom en 1000  $\mu\text{L}$  plasmaprøve og en 200  $\mu\text{L}$  plasmaprøve, klippet med trypsin.



Figur 6.22: Kromatogram av en 1000  $\mu\text{L}$  plasmaprøve.

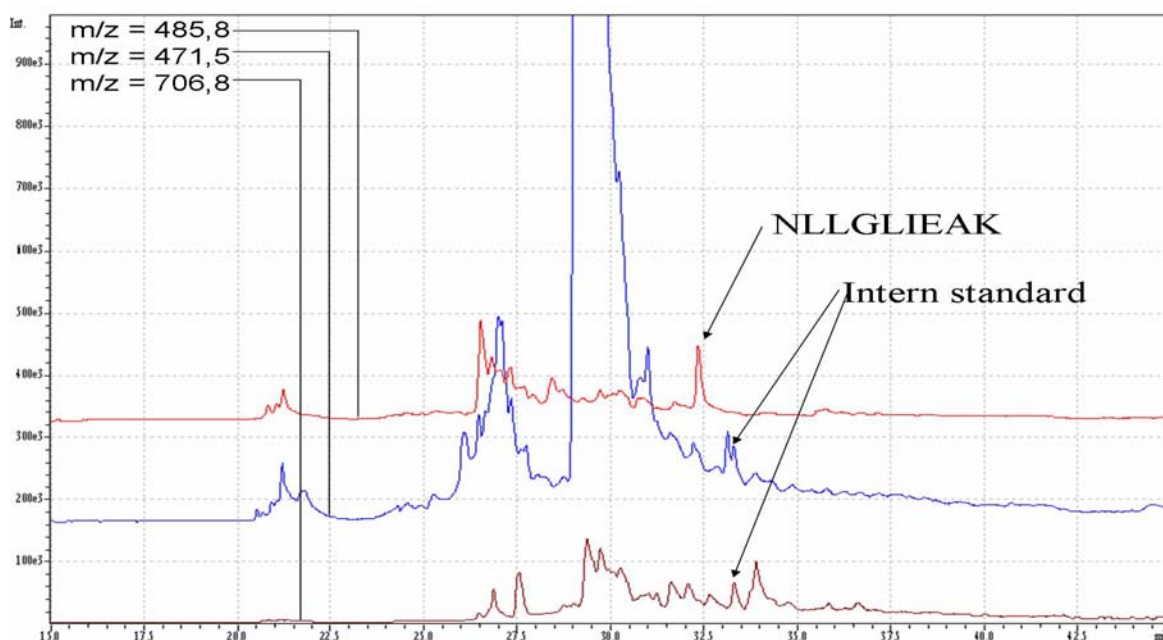


Figur 6.23: Kromatogram av en 200  $\mu\text{L}$  plasmaprøve.

### 6.4.2. Plasmaprøver med Lys-C

For å oppnå en mer fullstendig digest, ble det gjort forsøk med Lys-C på en 1000 µL plasmaprøve. Dette var en mer tids- og arbeidskrevende metode, men vil til gjengjeld kunne medføre en bedre digest. Forsøket ble gjort på følgende måte:

Et rør ble tilsatt: 988 µL plasma, 2 µL 1,2 mg/mL ProGRP (31-98) og 10 µL intern standard. Prøveopparbeidelsen ble utført som beskrevet i avsnitt 5.4. Prøvene ble reløst i 500 µL 8 M urea. Det ble deretter tilsatt 5 µL Lys-C men en konsentrasjon på 100 µg/mL, og røret ble plassert i varmeskap ved 37 °C i 4 timer. Trypsin mister som nevnt enzymaktivitet over 2 M urea, og derfor ble det tilsatt 1500 µL ABC for å sikre at ureakonsentrasjonen kom under 2 M. Deretter ble det tilsatt trypsin i forhold 1:20 og inkubert som beskrevet i avsnitt 5.4. Etter 24 timer, ble prøven dampet til tørrhet, reløst i 500 µL TEA og analysert på LC-MS (se figur 6.24). Reløsningen ble gjort for å få en oppkonsentrering av prøven, og ikke en fortynning. Ureasaltene vil på grunn av RAM-kolonnen, ikke skape problemer. Under loading av prøve på RAM-kolonnen (posisjon 0), vil blant annet hydrofile salter som urea ikke retarderes, men elueres ut i waste.



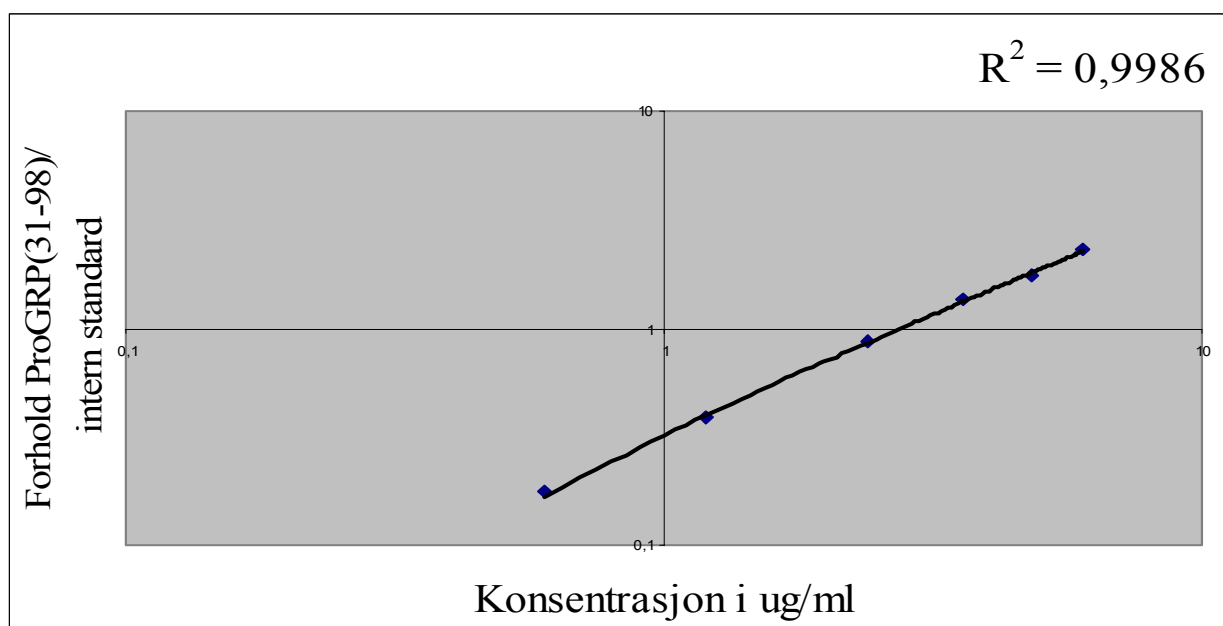
Figur 6.24: Kromatogram av en 1000 µL plasmaprøve med Lys C.

Figur 6.24 viser at ved å foreta en predigest med Lys-C gir signaler for både NLLGLIEAK og intern standard. Ved å sammenligne figur 6.22 med figur 6.24, er det tydelig at en slik

dualdigest med Lys-C og trypsin ga bedre resultater enn ved å bare bruke trypsin alene på 1000 µL plasmaprøver.

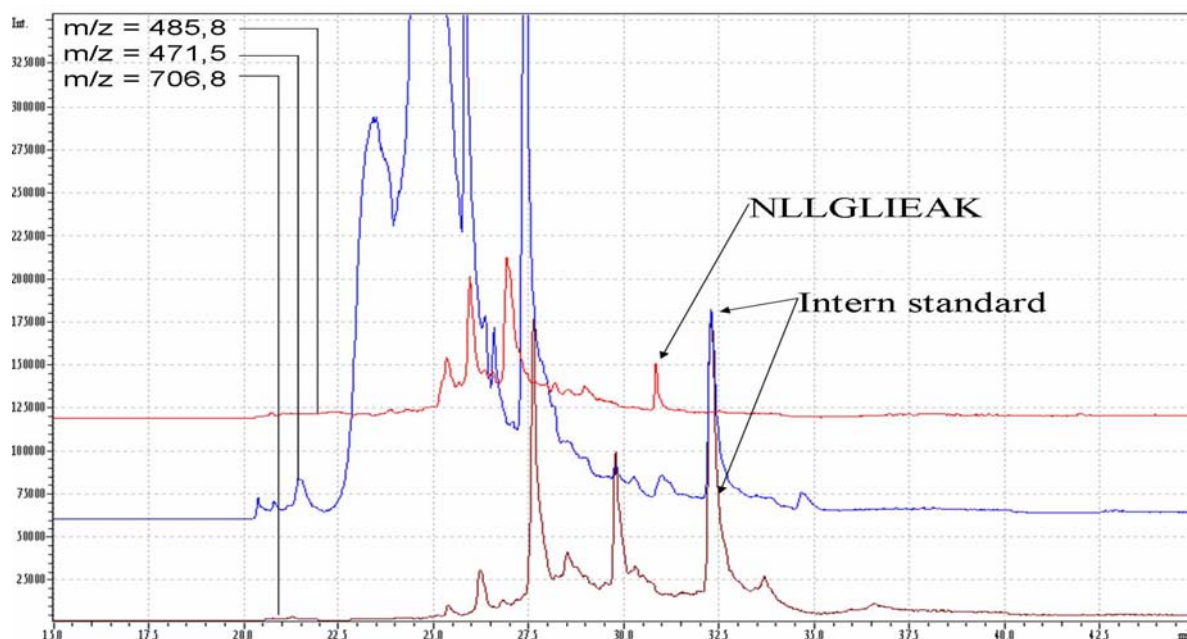
#### 6.4.3. Kalibreringskurve i plasma

Kalibreringskurver i plasma ble utført som beskrevet i avsnitt 5.10. Figur 6.25 viser kalibreringskurven hvor forholdet mellom topphøydene til ProGRP (31-98) og intern standard er plottet mot konsentrasjon.



Figur 6.25: Kalibreringskurve i plasma (begge aksene er i logaritmisk skala)

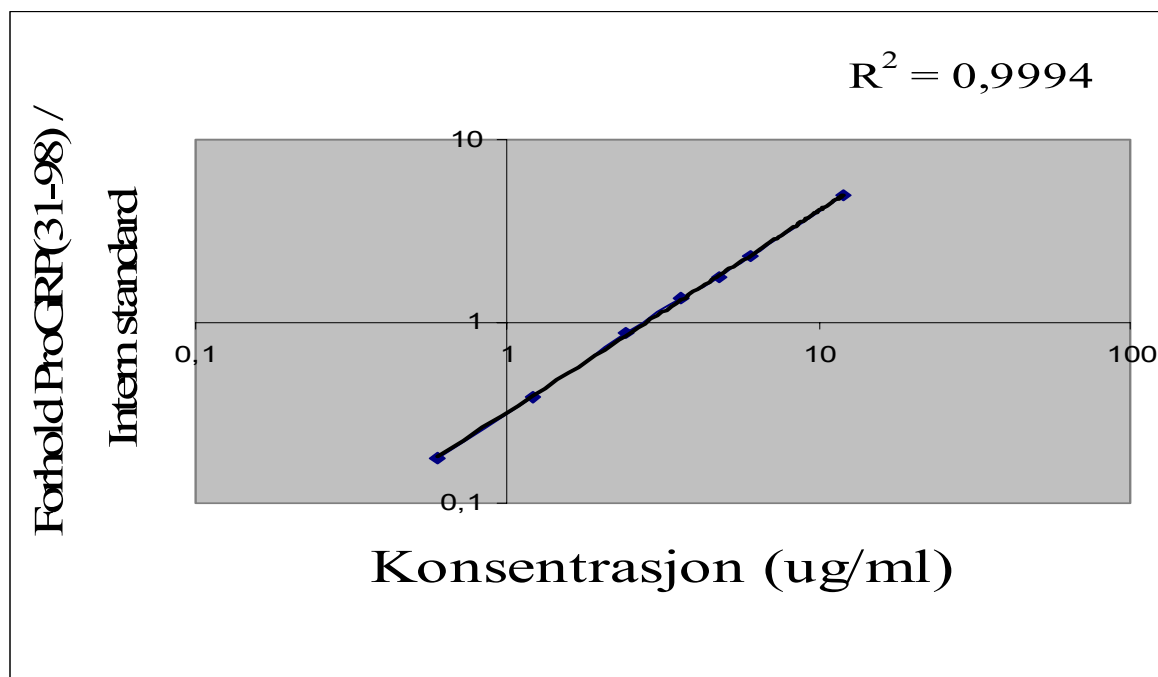
Kalibreringskurven viser en R<sup>2</sup>-verdi på 0,999. Dette resultatet viser at metoden også kan benyttes for plasmaprøver. LOD og LOQ ble beregnet ut i fra den laveste konsentrasjonen i kurven og utregningen er vist i avsnitt 6.5.4. Figur 6.26 viser kromatogrammet fra den laveste konsentrasjonen av ProGRP (31-98) i kalibreringskurven som var 0,6 µg/mL.



Figur 6.26: Kromatogram av 0,6 µg/mL plasmaprøve fra kalibreringskurve i figur 6.25.

#### 6.4.4. Kalibreringskurve i plasma med Lys-C

Kalibreringskurve som innebar en predigest med Lys-C ble utført med de samme konsentrasjonene som for kalibreringskurven vist i figur 6.25. Prøveopparbeidelsen ble utført som beskrevet i materialer og metoder. Prøvene ble reløst i 200 µL 8 M urea. Deretter ble det tilsatt 5 µL 100 µg/mL Lys-C, og rørene ble plassert i varmeskap ved 37 °C i 4 timer. Etter predigesten ble det tilsatt 800 µL TEA for å sikre at ureakonsentrasjonen kommer under 2 M. Deretter ble det tilsatt trypsin i forhold 1:20, og prøvene ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. Prøvene ble deretter inndampet til tørrhet og reløst i 200 µL TEA og analysert på LC-MS.

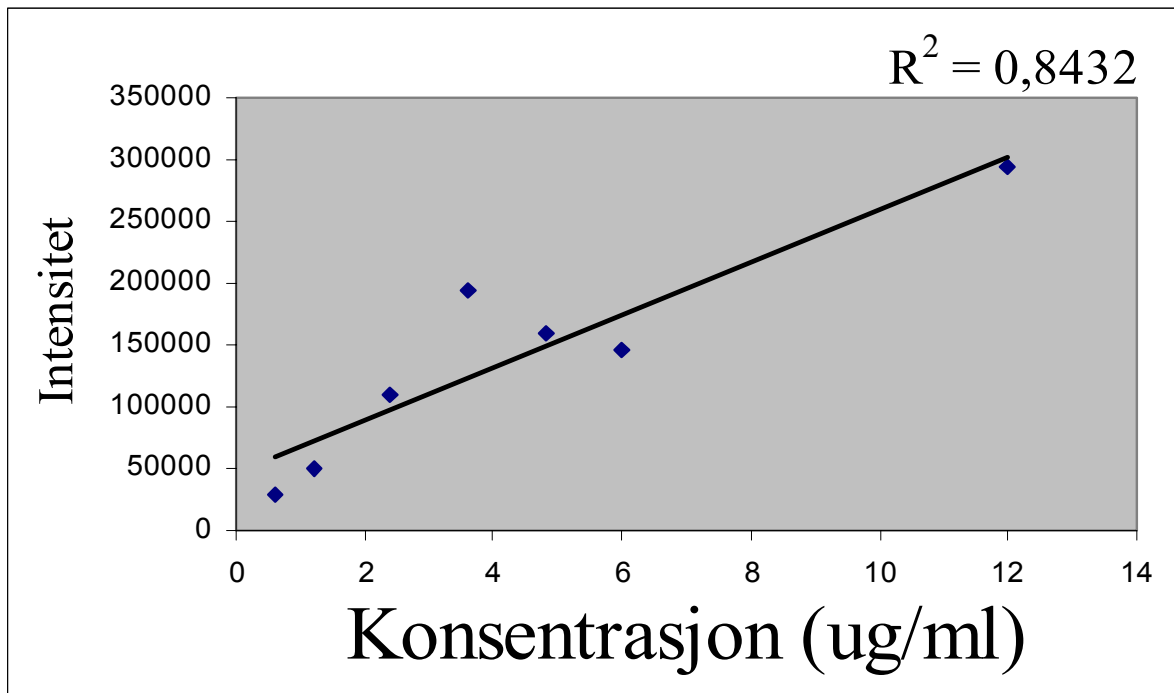


Figur 6.27: Kalibreringskurve i plasma med Lys-C.

Kalibreringskurven viser en  $R^2$ -verdi på 0,999. For 200  $\mu$ L plasmaprøver var det ikke signifikant forskjell på lineariteten med og uten bruk av Lys-C, men bruk av Lys-C var tids- og ressurskrevende. Det ble derfor besluttet å ikke fortsette med Lys-C i kvantifiseringsbestemmelse av ProGRP (31-98) i plasma. En dualdigest vil trolig komme mer til nytte dersom konsentrasjonene på analyttene er enda lavere, plasmavolumet er større eller hvis flere biomarkører skal analyseres i en og samme metode.

#### 6.4.5. Kalibreringskurver med og uten tilsetning av intern standard

For å finne ut om resultatene ble like bra uten intern standard ble det satt opp en kalibreringskurve som ikke tok høyde for korrigering fra intern standard. Topp høydene til  $m/z = 485,8$  ble plottet mot ProGRP(31-98)-konsentrasjon, og er vist i figur 6.28. Data ble hentet fra analysen som ble utført for å etablere kalibreringskurven som er vist i figur 6.25.

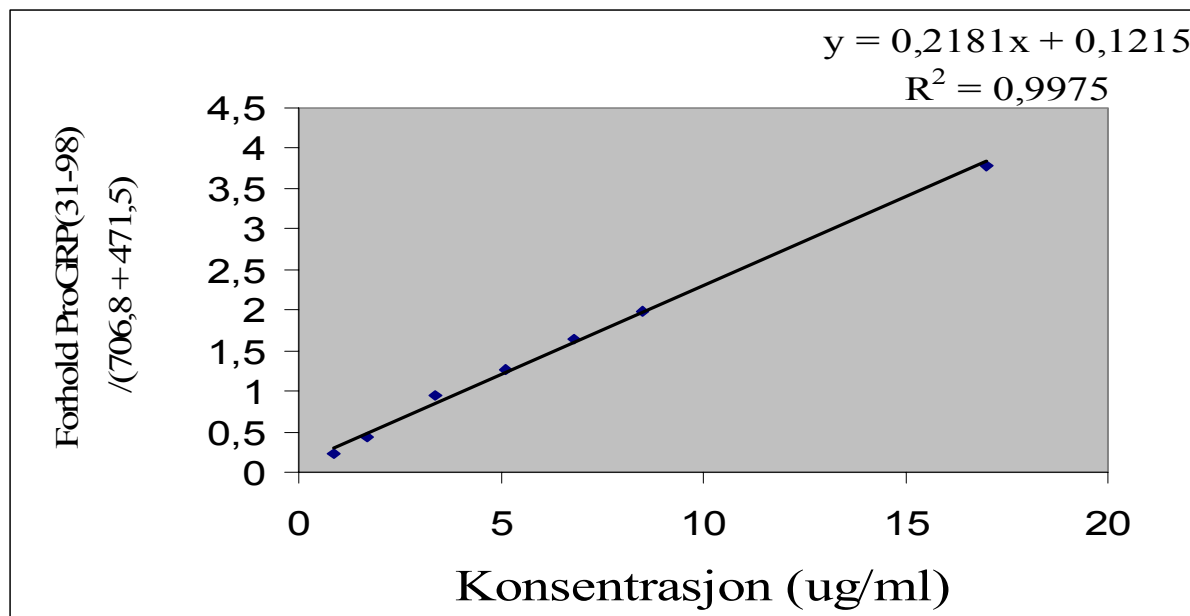


Figur 6.28: Kalibreringskurve uten intern standard.

Kurven viser en  $R^2$ -verdi på 0,843. Når kalibreringskurvene med (figur 6.25) og uten intern standard (figur 6.28) sammenlignes, er det tydelig at tilsetning av intern standard har en effekt på lineariteten. Dette vil igjen føre til at kvantifiseringen blir mer nøyaktig, og den diagnostiske nytten av intern standarden vil dermed øke.

## 6.5. Evaluering av metoden

### 6.5.1. Ukjent prøve



Figur 6.29: Kalibreringskurve for ukjente- og pasientprøver.

Det ble først etablert en kalibreringskurve som vist i figur 6.29. To rør ble tilsatt henholdsvis 2,5 µL og 0,8 µL av en 1,7 mg/mL ProGRP (31-98)-løsning. Hensikten var å få ett inntrykk av nøyaktigheten til kvantifiseringsmetoden. Fremgangsmåten er beskrevet i avsnitt 5.12.2. Regresjonslinjen ( $y = 0,2181x + 0,1215$ ) fra kalibreringskurven ble benyttet for å bestemme konsentrasjonen til de ukjente prøvene. Tabell 6.7. viser sann verdi, analysert verdi og %-avvik fra sann verdi.

Tabell 6.7: Sann verdi, analysert verdi og %-avvik for ukjente prøver.

|                | Sann verdi | Analysert verdi | %-avvik |
|----------------|------------|-----------------|---------|
| Ukjent prøve 1 | 4,25 µg/mL | 4,63 µg/mL      | 8,9     |
| Ukjent prøve 2 | 1,36 µg/mL | 1,64 µg/mL      | 20,6    |



Resultatene viste for ukjent prøve 1 et avvik på 8,9 % og for ukjent prøve 2 et avvik på 20,6 %. Metoden er i et tidlig stadium, og disse avvikene ligger innenfor det akseptable for biologiske prøver.

### 6.5.2. Linearitet

Linearitet er egenskapen metoden har til å gi kalibreringskurver hvor responsen er en lineær funksjon av konsentrasjonen innenfor et gitt konsentrasjonsområde. Linearitet dokumenteres ved lineær regresjon. Regresjonslinjen  $y = ax + b$  (hvor  $y$  er respons,  $x$  er konsentrasjon og  $b$  er kurvens skjæringspunkt med  $y$ -aksen) og regresjonskoeffisienten  $r$  regnes ut. Regresjonskoeffisienten bør helst ha en  $R^2$ -verdi på 0,999, men lavere verdier kan aksepteres avhengig av hva metoden skal brukes til. Lineariteten til denne metoden er på 0,999 både for vandige- og plasmaprøver. Dette er akseptabelt da metoden er i et tidlig stadium og enda er i utviklingsfase.

### 6.5.3. Repeterbarhet

For å finne variansen i forholdet mellom topphøydene til NLLGLIEAK og intern standarden (2- og 3 ganger ladet molekyl), ble RSD for 4 standardprøver i 2 konsentrasjonsnivåer regnet ut. Prøvene ble analysert på samme dag. Disse er oppgitt i tabell 6.8.

*Tabell 6.8: RSD for forholdet mellom topphøydene til  $m/z = 485,8 / (706,8+471,5)$  for 4 prøver i 2 konsentrasjonsnivåer analysert på samme dag.*

| Konsentrasjon ProGRP (31-98) | RSD for forholdet mellom $m/z = (485,8/(706,8+471,5))$ |
|------------------------------|--|
| 1,7 µg/mL                    | 7,96 %   |
| 3,4 µg/mL                    | 5,83 %   |

Resultatene viste at repeterbarheten for forholdet mellom NLLGLIEAK og intern standard ligger godt under 10 % for begge konsentrasjonsnivåene. Det ble observert at intensiteten til

$m/z = 485,8$  (ProGRP (31-98)) falt for hver prøve som ble analysert, noe som trolig skyldtes at MS ikke tålte flere plasmainjeksjoner på rad. Forholdet mellom ProGRP (31-98) og intern standarden ble likevel det samme, noe som skyldes at intensitetene til intern standarden ( $m/z = 706,8$  og  $471,5$ ) falt tilsvarende. RSD for retensjonstidene for ProGRP (31-98) og intern standard ble også regnet ut fra de samme analysene. Tabell 6.9. viser RSD for retensjonstidene til  $m/z = 485,8$ ,  $706,8$  og  $471,5$ .

*Tabell 6.9: RSD for retensjonstiden til ProGRP (31-98) og intern standard.*

| <b>RSD for tr for <math>m/z = 485,8</math></b> | <b>RSD for tr for <math>m/z = 706,8</math> og <math>471,5</math></b> |
|--|--|
| 0,56 %   | 0,48 %   |

Retensjonstidene for ProGRP (31-98) og intern standard hadde et relativt standard avvik på henholdsvis 0,56 % og 0,48 %. Dette viste at analyttene hadde en stabil retensjonstid på BioBasic-kolonnen.

#### 6.5.4. LOD og LOQ

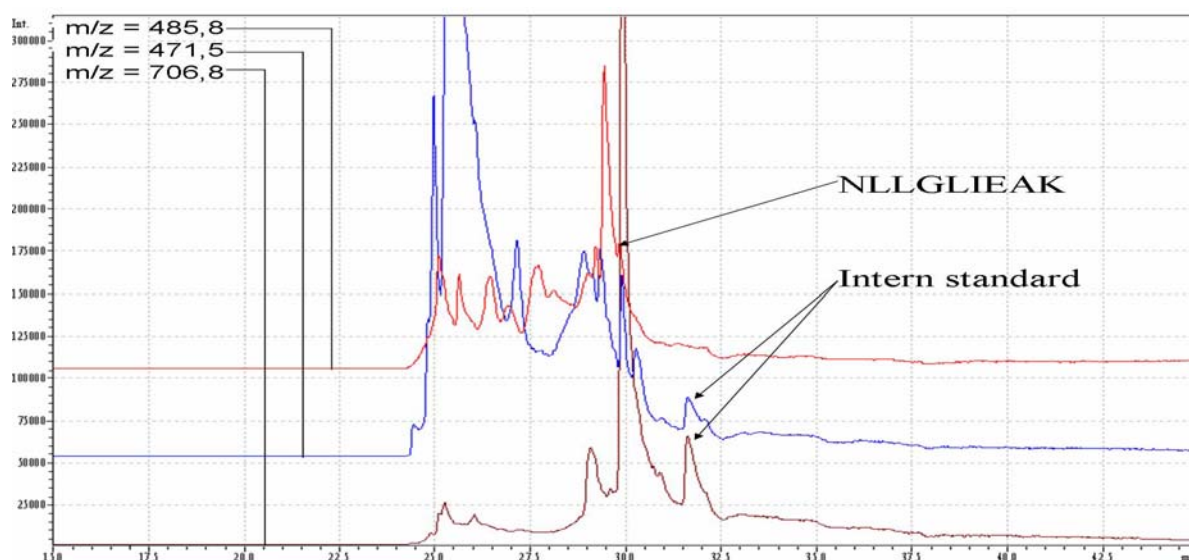
LOD og LOQ ble beregnet ut i fra kromatogrammet til den laveste konsentrasjonen i kalibreringskurven vist i figur 6.25. LOD og LOQ beskriver henholdsvis deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen. LOD angir den laveste konsentrasjon av stoff som med sikkerhet kan detekteres i prøven med den aktuelle analysemetoden. En analysemetodes deteksjonsgrense påvirkes av parametere som prøvens sammensetning og utbytte etter prøveopparbeidelse. Siden det inngår kromatografisk separasjon vil også parametere som injeksjonsvolum, løsemiddel og separasjonssystemets effektivitet samt detektorens egenskaper være avgjørende. Deteksjonsgrensen ble her bestemt som konsentrasjonen i prøveløsningen som gir et spesifisert signal-til-støy-forhold (signal-to-noise ratio = S/N ratio). Med støy menes at grunnlinjen ikke er en rett strek, men den blir ruglete og bred. Dette skjer som følge av at detektorsignalet er kraftig forsterket (17). Signal-til-støy-forholdet (S/N) ble beregnet etter følgende formel:  $S/N = H/h$ , hvor H er topphøyden til prøven, og h er høyden av støyen. Deteksjonsgrensen defineres som  $S/N = 3$ , hvor S er topphøyden og N er topphøyden på støyen. Topphøyden, H, til ProGRP (31-98) var 27245, og topphøyden til støyen ble satt til 500. Toppen H fremkom ved å injisere 20  $\mu\text{L}$  av 0,6  $\mu\text{g/mL}$  ProGRP (31-

98). Dette tilsvarer 12 ng O.C. Deteksjonsgrensen ble da:  $LOD = 12 \text{ ng} \times (3 \times 500/27245) = 660 \text{ pg O.C.}$  Konsentrasjonsnivåene av ProGRP for henholdsvis LD og ED er  $862 \pm 1204 \text{ pg/mL}$  og  $1645 \pm 1491 \text{ pg/mL}$  (10). For å kunne fange opp pasienter hvis sykdomsbildet er av begrenset omfang (LD), blir utfordringen å kunne klare å injisere 1 mL plasma i LC-MS. I prøver fra alvorlige syke pasienter, med fremskreden lungekreft, kan ProGRP detekteres med gjeldene metode.

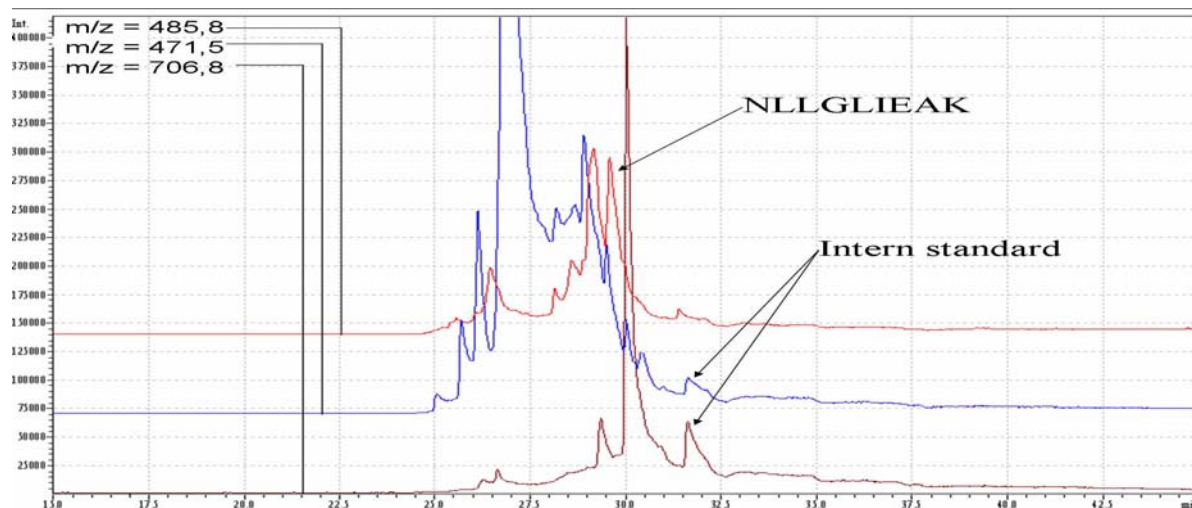
LOQ defineres som den laveste konsentrasjon av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon. LOQ uttrykkes som konsentrasjon av analytt i aktuell matriks. Kvantifiseringsgrensen kan som deteksjonsgrensen bestemmes ut fra S/N-forholdet, og i kromatografi benyttes vanligvis  $S/N = 10$  som LOQ. Topphøyden fra 0,6  $\mu\text{g/mL}$  ProGRP (31-98) var 27245 og topphøyden til støyen ble satt til 500. Kvantifiseringsgrensen for gjeldene metode blir da:  $LOQ = 12 \text{ ng} \times (10 \times 500/27245) = 2,2 \text{ ng}$ . Dette medfører at det kun er ekstreme ProGRP-konsentrasjoner som kan kvantifiseres.

## 6.6. Pasientprøver

Det ble først etablert en kalibreringskurve som er vist i figur 6.29. Prøveoppbeidelsen til pasientprøvene ble utført som beskrevet i materialer og metoder. Figur 6.30 og 6.31 viser kromatogrammene fra analyse av henholdsvis en pasientprøve og en spiket pasientprøve.



Figur 6.30: Kromatogram av pasientprøve.  $m/z = 485,8$  ligger på skulderen til den markante toppen som pilen til NLLGLIEAK peker på.



Figur 6.31: Kromatogram av spiket pasientprøve.

Det viste seg at intensiteten til ProGRP (31-98) ( $m/z = 485,8$ ) var lavere enn kvantifiseringsgrensen (LOQ), noe som umuliggjør kvantifiseringen med kalibreringskurven i figur 6.29. Det ble likevel detektert en topp for  $m/z = 485,8$ , og semikvantitativt sett er dette trolig en prøve fra en pasient med en fremskreden kreftsykdom (ED). Da konsentrasjonsnivåene av ProGRP for henholdsvis LD og ED er  $862 \pm 1204$  pg/mL og  $1645 \pm 1491$  pg/mL (10), er det vanskelig med gjeldene prøveopparbeidelse og apparatur å kunne kvantifisere ProGRP i pasientprøver.

## 7. KONKLUSJON

I denne oppgaven ble det utviklet en metode for å kvantifisere biomarkøren ProGRP med LC-MS.

For å kunne bestemme ProGRP må det klippes med trypsin. Det spesifikke klippproduktet, NLLGLIEAK, ble verifisert som det mest fordelaktige peptidet til å monitorere modersubstansen ProGRP med tanke på signalintensitet, kolonneretensjon og peptidspesifisitet.

Det ble laget en intern standard, NLLGLIEAKacENR, til klippproduktet NLLGLIEAK, da det ikke eksisterer noen isotop-analoger til dette formålet. Peptidproduktet inneholdt tre aminosyrer (ENR) og en acetylgruppe mer enn produktet som skulle monitoreres. Peptidproduktet var kromatografisk separert fra endogent NLLGLIEAK og stabiliteten var tilfredstillende. Intern standarden hadde en retensjonstid nær NLLGLIEAK og det oppførte seg likt med tanke på proteinfelling og tryptisk klipp. LC-MS/MS-analyse med fragmentering verifiserte aminosyresekvensen til intern standarden (NLLGLIEAKacENR).

Acetyleringsbetingelsene ble optimalisert med hensyn på reaksjonstid og konsentrasjon av ac-NHS. Det ble i tillegg etablert en metode for inaktivering av ac-NHS etter endt reaksjon med  $\text{NH}_3$ .

Ved å sammenligne en kalibreringskurve i plasma tilsatt intern standard med en kurve som ikke inneholdt intern standard, kom det tydelig til uttrykk at intern standarden hadde stor nytteverdi. Kurven som inneholdt intern standard hadde en  $R^2$ -verdi på 0,999, mens kurven som ikke inneholdt intern standard hadde en  $R^2$ -verdi på 0,843. For å kunne benytte metoden på pasientprøver, må imidlertid kalibreringskurvene etableres med lavere konsentrasjoner.

To (for operatøren) ukjente prøver ble analysert for å få et inntrykk av metoden. Resultatene viste et avvik på henholdsvis 8 og 20 % fra sann verdi. Dette er akseptabelt da metoden på nåværende tidspunkt er i utviklingsstadiet.

Repeterbarheten for forholdet mellom  $m/z = 485,8$  (ProGRP (31-98)) og summen av  $m/z = 706,8$  og  $471,5$  (intern standard) viste en varians mellom 5-8 %. Retensjonstiden for de tre peptidproduktene var stabil og hadde en varians under 1 %. Det ble observert at intensiteten

for ProGRP (31-98) falt for hver kjøring, intern standarden falt imidlertid tilsvarende, og korrigerte dermed for dette.

LOD og LOQ for ProGRP (31-98) i plasma ble kalkulert til henholdsvis 660 pg O.C og 2.2 ng O.C. Gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon for ProGRP er 862 og 1645 pg/ml for henholdsvis LD og ED. Det synes derfor vanskelig å differensiere mellom de ulike stadiene av sykdommen ved å benytte tilnærmelsen beskrevet i oppgaven. En mulig løsning for å oppnå lavere deteksjons- og kvantifiseringsgrenser er å benytte trippel kvadrupol eller lignende følsomme detektorer. På denne måten kan LOD og LOQ senkes og ProGRP i pasientprøver vil kunne kvantifiseres.

## 8. REFERANSELISTE

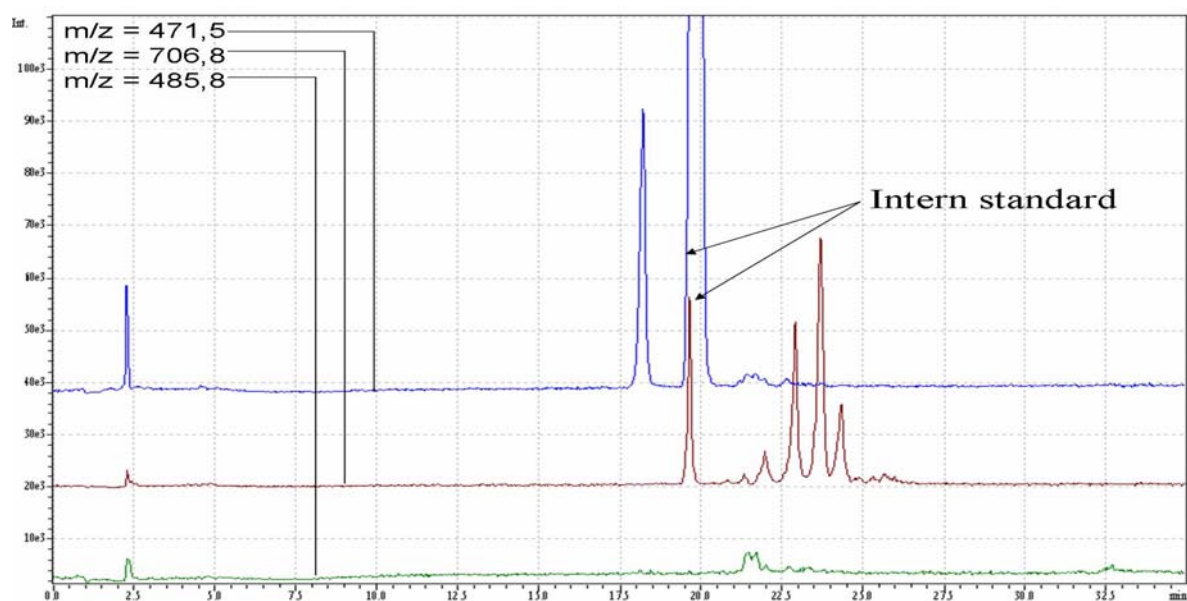
1. Molina R, Filella X, Auge JM: ProGRP: a new biomarker for small cell lung cancer. *Clinical Biochemistry* 37:505-511, 2004
2. Yamaguchi K, Stieber P: Diagnosis of small cell lung cancer by Pro gastrin releasing peptide (ProGRP). *Laboratoriumsmedizin* 27:26-30, 2003
3. Thatcher N, Faivre-Finn C, Lorigan P: Management of small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16 Suppl 2:ii235-239, 2005
4. Niho S, Nishiwaki Y, Goto K, Ohmatsu H, Matsumoto T, Hojo F, Ohe Y, Kakinuma R, Kodama T: Significance of serum pro-gastrin-releasing peptide as a predictor of relapse of small cell lung cancer: comparative evaluation with neuron-specific enolase and carcinoembryonic antigen. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 27:159-167, 2000
5. Giulio Tarro APCE: Early diagnosis of lung cancer by detection of tumor liberated protein. *Journal of Cellular Physiology* 203:1-5, 2005
6. Dumesny C, Patel O, Lachal S, Giraud AS, Baldwin GS, Shulkes A: Synthesis, expression and biological activity of the prohormone for gastrin releasing peptide (ProGRP). *Endocrinology* 147:502-509, 2006
7. Martinez A: A new family of angiogenic factors. *Cancer Letters* 236:157-163, 2006
8. McDonald TJ, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V: A gastrin releasing peptide from the porcine nonantral gastric tissue. *Gut* 19:767-774, 1978
9. Yamaguchi K, Abe K, Kameya T, Adachi I, Taguchi S, Otsubo K, Yanaihara N: Production and molecular size heterogeneity of immunoreactive gastrin-releasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. *Cancer research* 43:3932-3939, 1983

10. Aoyagi K, Miyake Y, Urakami K, Kashiwakuma T, Hasegawa A, Kodama T, Yamaguchi K: Enzyme immunoassay of immunoreactive progastrin-releasing peptide(31-98) as tumor marker for small-cell lung carcinoma: development and evaluation. *Clinical Chemistry (Washington, D. C.)* 41:537-543, 1995
11. Winther B, Reubsaet JLE: Determination of the Small Cell Lung Cancer associated biomarker pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) using LC-MS. *Submitted Journal of Separation Science*, 2006
12. Molina R, Auge JM, Alicarte J, Filella X, Vinolas N, Ballesta AM: Pro-gastrin-releasing peptide in patients with benign and malignant diseases. *Tumor Biology* 25:56-61, 2004
13. Nisman B, Heching N, Biran H, Barak V, Peretz T: The Prognostic Significance of Circulating Neuroendocrine Markers Chromogranin A, Pro-Gastrin-Releasing Peptide and Neuron-Specific Enolase in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Tumor Biology* 27:8-16, 2006
14. Barnidge David R, Goodmanson Marcia K, Klee George G, Muddiman David C: Absolute quantification of the model biomarker prostate-specific antigen in serum by LC-MS/MS using protein cleavage and isotope dilution mass spectrometry. *Journal of proteome research* 3:644-652, 2004
15. Rudolphi A, Boos KS, Seidel D: Coupled-column HPLC analysis of free urinary catecholamines using restricted access affinity precolumn and micro-particulate nonporous silica analytical column. *Chromatographia* 41:645-650, 1995
16. Vielhauer S, Rudolphi A, Boos KS, Seidel D: Evaluation and routine application of the novel restricted-access precolumn packing material Alkyl-Diol Silica: coupled-column high-performance liquid chromatographic analysis of the photoreactive drug 8-methoxypsoralen in plasma. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications* 666:315-322, 1995
17. Pedersen-Bjergard S, K.E Rasmussen: *Legemiddelanalyse*. Oslo, Fagbokforlaget, 2004
18. Aebersold R, Mann M: Mass spectrometry-based proteomics. *Nature (London, United Kingdom)* 422:198-207, 2003

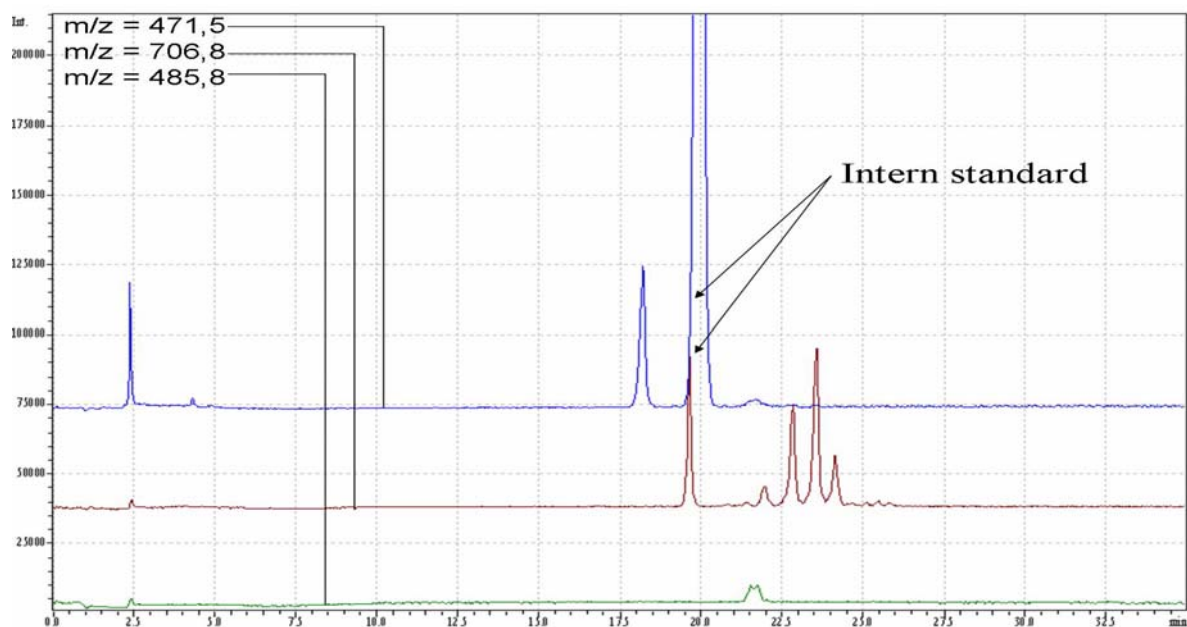


19. Gaskell SJ: Electrospray: principles and practice. *Journal of Mass Spectrometry* 32:677-688, 1997
20. Petrovic S: Chapter 11 & 20 - Mass spectrometry.  
<http://www.sou.edu/chem/ch425/MassSpec-Chapter20/sld023.htm>, 2005
21. Liebler DC: *Introduction to proteomics*, 2002
22. Olsen JV, Ong S-E, Mann M: Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Molecular and Cellular Proteomics* 3:608-614, 2004
23. Choudhary G, Wu S-L, Shieh P, Hancock WS: Multiple enzymatic digestion for enhanced sequence coverage of proteins in complex proteomic mixtures using capillary LC with ion trap MS/MS. *Journal of Proteome Research* 2:59-67, 2003
24. Morpurgo M, Bayer EA, Wilchek M: N-hydroxysuccinimide carbonates and carbamates are useful reactive reagents for coupling ligands to lysines on proteins. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 38:17-28, 1999
25. Miland E, Smyth MR, Fagain CO: Increased thermal and solvent tolerance of acetylated horseradish peroxidase. *Enzyme and Microbial Technology* 19:63-67, 1996

## 9. APPENDIKS



Figur 9.1: Kromatogram som viser ProGRP (31-98) tilsatt ac-NHS, som har stått i romtemperatur i 24 timer før acetylering.



Figur 9.2: Kromatogram som viser ProGRP (31-98) tilsatt ac-NHS, som har blitt tilsatt vann før acetylering.